20 MN

Morphologische und physiologische Untersuchungen an NOCARDIA HYDROCARBONOXIDANS n. spec.

von

GÜNTHER NOLOF

Hamburg 1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548107_0089

Morphologische und physiologische Untersuchungen an NOCARDIA HYDROCARBONOXIDANS n. spec.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Günther Nolof
aus Hamburg

Hamburg
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H. Engel

Hamburg, den 10.6.1961 Professor Dr. Kosswig
Dekan

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Meiner lieben Mutter

in Dankbarkeit gewidmet!

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1958 bis zum November 1960 in der Abteilung für Mikrobiologie des Staatsinstitutes für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg unter Leitung von Prof. Dr. H. E n g e l und mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. E n g e l , danke ich herzlich für sein stetes Interesse und seine Hilfe durch wertvolle Anregungen und Ratschläge.

Dem Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dr. W. M e v i u s , gebührt mein Dank für seine wohlwollende Anteilnahme.

Inhalt

Seite

A. Einleitung 4

B. Material und Methoden 5

C. Versuche und Ergebnisse 12

I. Morphologische Untersuchungen und kulturelles Verhalten von Noc. hydrocarbonoxidans n. spec. (Stamm 70) . 12

a. Allgemeine Charakteristik 12

b. Spezielle kulturelle Untersuchungen 17

c. Systematische Einordnung 22

II. Physiologische Untersuchungen 25

a. Verwertung von Esso-Petroleum, Esso-Varsol und Esso-Solvens durch Noc. hydrocarbon. 25

b. Einfluß anderer organischer Stoffe auf das Wachstum von Noc. hydrocar. 30

1. Leuchtgas und Wasserstoff . . 31

2. Flüssige organische Substanzen 32

c. Oxydation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen und ihren Oxydationsprodukten durch Noc. hydrocarbon. . 32

1. Kohlenwasserstoffe 32

2. RQ-Werte bei Oxydation von Undecan und Tridecan 44

3. Alkohole 47

4. RQ-Wert bei Oxydation von Dekanol 51

5. Aldehyde 52

6. Säuren 55

d. CO_2-Bedürfnis 62

e. Kohlenstoffeinbau in die Aminosäuren des Zellmaterials 64

f. Schlußbetrachtungen 66

1. Diskussion der Literatur . . . 66

2. Diskussion der eigenen Versuche 71

D. Zusammenfassung 74

E. Literatur 76

A. Einleitung

Bei ihren Bemühungen, Bac. oligocarbophilus Beijerinck und van Delden neu zu isolieren, stießen H i r s c h und E n g e l (1956) auf mehrere sehr ähnliche Actinomyceten. Sie alle wuchsen langsam auf rein mineralischer Nährlösung ohne besonders zugesetzte C- und Energiequelle mit Hilfe von in der Laborluft vorhandenen Substanzen. Einer davon, Noc. petroleophila n. spec., wurde eingehend beschrieben und später auch stoffwechselphysiologisch näher untersucht (H i r s c h 1958). Es wurde festgestellt, daß Petroleum und besonders die darin enthaltenen gesättigten Kohlenwasserstoffe das Wachstum dieses Strahlenpilzes förderten. Dabei blieben allerdings noch einige Fragen offen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun zunächst einmal die schon bei H i r s c h und E n g e l (1956) erwähnte Noc. n. spec. Stamm 70 in ihrem morphologischen und kulturellen Verhalten untersucht und klar gegenüber Noc. petroleophila und anderen verwandten Arten abgegrenzt. Auch die neue Art oxydiert Petroleum und reine Kohlenwasserstoffe und wird dadurch im Wachstum begünstigt. Aus diesem Grunde wird der Name Noc. hydrocarbonoxidans n. spec. für sie vorgeschlagen. Es wurde dann versucht, Aufschluß über den Weg zu erhalten, den Noc. hydrocarbonoxidans bei der Verwertung reiner Kohlenwasserstoffe beschreitet. Schließlich sollte mit Hilfe der Tracertechnik geklärt werden, ob Kohlenwasserstoffe auch als Kohlenstoffquelle für diesen Organismus in Frage kommen.

B. Material und Methoden

Für alle Untersuchungen wurde Nocardia n. spec. Stamm 70 (H i r s c h und E n g e l 1956) verwendet. Dieser Stamm wurde aus der Sammlung der mikrobiologischen Abteilung des Staatsinstitutes für allgem. Botanik Hamburg übernommen. Durch mehrmaliges Ausspateln auf Mineral-Agar-Platten wurde die Reinheit sichergestellt. In den folgenden Jahren wurde der Organismus in 100-ml-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 40 ml mineralischer Nährlösung als Stammkultur gehalten. Die Kolben wurden durch Wattestopfen verschlossen und zusätzlich mit Aluminiumkappen versehen, um die Verdunstung herabzusetzen. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Vor jeder Abimpfung wurde mit Hefewasser-Bouillon-Röhrchen, pH = 7.2, auf Reinheit der Stammkulturen geprüft. Noc. n. spec. Stamm 70 zeigt hierauf kein Wachstum, durch eine Trübung wurden stets heterotrophe Verunreiniger angezeigt.

Zum Vergleich des Wachstums auf verschiedenen Nährböden wurden Noc. petroleophila (H i r s c h und E n g e l 1956) und Noc. saturnea (H i r s c h 1960) herangezogen.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Untersuchungen folgende mineralische Standard-Nährlösung (= ST) verwandt:

K_2HPO_4 (puriss.)	1.0 g
$NaNO_3$	2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.5 g
KCl	0.5 g
$CaCl_2$	0.125 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	Spur
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	"
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	"
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	"

NH_4VO_3	Spur
Leitungswasser	800 ml
Aqua dest.	200 ml

Bei den angegebenen Reagenzien handelt es sich, wenn nichts Besonderes erwähnt wird, um p.a.-Substanzen von Merck bzw. Riedel-de-Haen. Das sekundäre Kaliumphosphat wurde im dest. Wasser, die übrigen Salze wurden im Leitungswasser gelöst und dann beides vereinigt. Mit n H_2SO_4 wurde am KNICK-pH-Meter (Vereinfachte Ein-Punkt-Eichung gegen Standard-Acetat, pH = 4.62) auf pH = 7.0 eingestellt, dann 30 Min. bei 120°C im Autoklaven erhitzt. Nach Erkalten wurde durch ein Faltenfilter filtriert und die klare Lösung in die Kulturkolben abgefüllt. Die eigentliche Sterilisation wurde daraufhin bei 113°C für 20 Min. im Autoklaven vorgenommen. Zunächst trat noch ein Niederschlag auf, der sich aber nach einiger Zeit, während die Kolben im Labor standen, vollkommen löste (CO_2-Gleichgewicht!). Erst dann wurde beimpft.

Von dieser mineralischen Standard-Nährlösung (ST) wurden für verschiedene Untersuchungen Abweichungen bzw. Ergänzungen vorgenommen.

So wurde zur Prüfung, ob Noc. St. 70 gebundenen Stickstoff in Nitrat- oder Ammonform bevorzugt, das Natriumnitrat durch die äquimolare Menge Ammonsulfat $(NH_4)_2SO_4$ = 1.550 g/Ltr. bezogen auf Stickstoff ersetzt.

Um zu einem festen Nährboden zu kommen, wurden zur Nährlösung (ST) 18 g/Ltr. aufgefaulter, gereinigter Agar hinzugesetzt. Die pH-Wert-Einstellung auf 7.0 wurde hierbei mit Merck-Spezialindikatorpapier 6.6 - 8.0 durchgeführt.

Bei weiteren Versuchen erhielt die Standardnährlösung (ST) Zusätze von je 0.1 % an Natriumacetat, Natriumoxalat und Natriumformiat, sowie Pepton (Brun-

nengräber) 1 g/Ltr., Glukose 1 g/Ltr. und Stärke 0.66 g/Ltr. Die Glukose und die Stärke wurden getrennt sterilisiert mittels Filtrieren durch ein bakteriendichtes Filter (11 G 5, Schott und Gen., Mainz) und dann zur sterilen Standardnährlösung zugegeben. Bei anderen Untersuchungen wurde eine Nährlösung mit einer auf 20 g heraufgesetzten $MgSO_4$-Gabe benutzt, (Nährlösung B, H i r s c h 1958) pH = 7.0, Sterilisation: 30 Min. 120°C. Bei dieser Nährlösung wurde der kräftige Niederschlag nicht abfiltriert.

Die Anzucht für die manometrischen Versuche erfolgte in 300- und 1000-ml-Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 (Schott u. Gen., Mainz) mit 70 bzw. 150 ml Standard-Nährlösung (ST) bei 30°C unter Esso-Varsol.

Die Kulturgefäße (Erlenmeyer-Kolben, Glasbecher, Deckgläser) wurden stets mit einer Waschmittellauge (Pril, Persil) gesäubert, sie kamen danach für 24 Stunden in Chromschwefelsäure, es folgte gründliches Wässern in Leitungswasser und Abspülen mit Aqua dest.

Zuerst wurde mit Wattestopfen aus gereinigter Augenwatte (Fa. P. Hartmann AG., Heidenheim/Brenz) als Verschluß gearbeitet. Als sich später jedoch erwies, daß sich ohne Gefahr einer erhöhtem Verunreinigung übergestülpte Glasbecher verwenden ließen, wurde der einfacheren Handhabung wegen dazu übergegangen.

Zur besseren systematischen Eingliederung der neuen Nocardia St. 70 wurden noch folgende Nährböden benutzt:

Haferflocken-Agar (H i r s c h und E n g e l 1956) pH = 7.2, Sterilisation: 20 Min. 120°C

Haferflocken-Glycerin-Pepton-Agar (H i r s c h 1960) pH = 7.2, Sterilisation: 20 Min. 120°C

Glycerin-Glykokoll-Agar (L i n d e n b e i n 1952) pH = 7.2 - 7.4, Sterilisation: 20 Min. 120°C.

Glycerin-KNO_3-Agar: Dieser Nährboden hat die gleiche Zusammensetzung wie der vorige, doch werden statt des Glykokolls 1 % KNO_3 als Stickstoffquelle genommen.
Glukose-Asparagin-Agar (L i n d e n b e i n 1952) pH = 7.4, Sterilisation: 20 Min. 113°C
Stärke-KNO_3-Agar (L i n d e n b e i n 1952) pH = 7.4, Sterilisation: 20 Min. 113°C.
Fleischextrakt-Pepton-Agar (Nähragar, L i n d e n - b e i n 1952), pH = 7.4 - 7.6, Sterilisation: 30 Min. 113°C
Glukose-Agar (L i n d e n b e i n 1952) pH = 7.0, Sterilisation: 30 Min. 113°C
Calzium-Malat-Agar (L i n d e n b e i n 1952) pH = 7.5, Sterilisation: 30 Min. 111°C
Malzextrakt-Agar

Malzextrakt (Difco)	25 g
Hefeextrakt (Vitam-R)	5 g
Pepton (Brunnengräber)	5 g
Agar	20 g
Leitungswasser	1000 ml

pH = 7.4 - 7.6, Sterilisation: 20 Min. 113°C
Kieselgel-Platten: Nach Vorschrift von T a y l o r (1950) wurde eine $Na_2Si_2O_5 \cdot 2\ H_2O$-Lösung (Natriumsilikat purum, siccum Merck) durch eine Ionenaustauscher-Säule (Dowex 50) geschickt und so ein Kieselsäuresol mit etwa 3 % SiO_2 erhalten. Sterilisation: 20 Min. 113°C. Dann wurde im Verhältnis 3 : 1 sterile Standard-Nährlösung (ST) mit Zusatz von NaCl 5 g /Ltr. hinzugefügt. pH-Wert nach Vereinigung 7.0.

Die Anfertigung der Mikroaufnahmen erfolgte mit einem Zeiß-W-Stativ, Leitz-Aufsatz mit Leicastutzen 1/2 x und einer Leica I auf Perutz-Dokumentenfilm.

Die Bestimmung der Zellmenge bei den manometrischen Versuchen, sowie des Bakterien-Zuwachses und der Zunahme der oxydablen Substanz der Nährlösung bei Weckglas- und Exsikkator-Versuchen wurde mit Ka-

liumpermanganat vorgenommen. Dabei wurde der Vorschrift von K u b e l (1889) gefolgt: Die fragliche Probe wurde mit einer Spatelspitze ausgeglühtem Bimssteinpulver und 5 ml H_2SO_4 (25 Gewichtsprozent) versetzt, kurz bis zum Sieden erhitzt, daraufhin eine ausreichende Menge n/100 $KMnO_4$-Lösung hinzugegeben, so daß beim folgenden Kochen die Lösung immer noch rot blieb. Dann wurde genau 10 Min. am Rückflußkühler gekocht und anschließend etwas mehr n/100 Natriumoxalatlösung zugegeben als nötig war, damit die Lösung farblos wurde. Das überschüssige Natriumoxalat wurde nach abermaligem kurzen Sieden mit n/100 $KMnO_4$ rücktitriert. Die Gesamtmenge n/100 $KMnO_4$ abzüglich der Menge zugegebener n/100 Na-Oxalat-Lösung ergab den Verbrauch an n/100 Kaliumpermanganat. Für die Weckglas- und Exsikkator-Versuche wurde diese Angabe als Vergleichsmaßstab benutzt. Für die manometrischen Versuche wurde eine Eichkurve aufgestellt. Auf Grund des Kaliumpermanganatverbrauchs konnten so Werte für Bakterien-Trockensubstanz (mg) gewonnen werden.

Untersuchungen über die Verwertbarkeit verschiedener flüssiger Substanzen über die Gasphase durch Noc. Stamm 70 wurden in 1-Ltr.-Weckgläsern oder Exsikkatoren vorgenommen. Die Testsubstanzen wurden darin in Penicillinfläschchen zu den Kulturkolben (100-ml- Weithals-Erlenmeyer-Kolben mit Glasbecherverschluß) gestellt. Zu prüfende Gase wurden in 50-ml-Glasglocken gedrückt und nach Schließen der Deckel durch Umkippen in den Innenraum entlassen. Die Schliffe wurden mit durch Paraffin verfestigter Vaseline gefettet, die Deckel zusätzlich durch Metallbügel festgepreßt.

Die manometrischen Versuche wurden mit Differentialmanometern und Warburg-Gefäßen mit Mitteleinsatz und zwei Seitenbirnen (Fa. Braun, Melsungen) durchgeführt. Die Wasserbadtemperatur betrug 30°C, die

Schüttelfrequenz 70/Min. oder 110/Min. und die Schüttelamplitude 3.6 oder 7.2 cm. Als Manometerflüssigkeit wurde Brodie-Lösung verwandt. Die Kompensationsgefäße enthielten nur einen winzigen Tropfen Wasser.

Alle verwendeten Testsubstanzen waren von der größtmöglichen verfügbaren Reinheit. Die Petroleumsorten (Esso-Solvens, Esso-Varsol, Esso-Petroleum) wurden direkt von der Esso AG., Hamburg, bezogen. Die reinen Kohlenwasserstoffe n-Undekan, n-Dodekan und n-Tridekan wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. HEYNS, Chemisches Staatsinstitut Hamburg, zur Verfügung gestellt. Die übrigen Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde und Fettsäuren waren Produkte von Th. Schuchardt GmbH., München, und der Fluka AG., Buchs/Schweiz.

Zur papierchromatographischen Analyse der Aminosäuren wurden die getrockneten Nocardia-Zellen mit 6 n HCl bei 110°C für 20 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft, dieser Vorgang wurde mit jeweils 25 ml Wasser fünfmal wiederholt, schließlich wurde in 2 ml Aqua dest. aufgenommen, mit einem Thymolkristall versetzt und im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt.

Bei der Entwicklung der Chromatogramme wurde die zweidimensionale, absteigende Methode bei 23°C benutzt, Filterpapier SS 602 h:P (Schleicher u. Schüll, Dassel). Als Lösungsmittel wurden verwendet: In der ersten Richtung n-Butanol (wassergesättigt)-Eisessig-Aqua dest. (9:1:1 Volumenteile), in der zweiten Richtung Pyridin-Amylalkohol-Aqua dest. (7:7:6 Volumenteile) (N ä v e k e 1957).

Die Aminosäureflecken auf dem Chromatogramm wurden durch Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz bestimmt, danach wurde ihre Radioaktivität (C^{14}) direkt auf dem Papier gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Methandurchflußzähler FH 407 mit Endfenster, einem Strahlungsmeßgerät FH 49 und einem Zeitdrucker FH 449

(alle Geräte Frieseke u. Höpfner, Erlangen-Bruck). Da nur relative Werte der Radioaktivität bestimmt werden sollten, wurden Korrekturen der Meßwerte nicht für notwendig erachtet, da die Meßbedingungen nicht verändert wurden.

Als radioaktive Präparate kamen zur Anwendung: Eine $BaC^{14}O_3$-Probe unbekannter Aktivität, die aus früheren Radiocarbon-Versuchen gewonnen worden war; C^{14}_1-Undekan (157.8 mg - 2.0 mC) von The Radiochemical Centre, Amersham/England.

Weitere methodische Einzelheiten werden jeweils bei den entsprechenden Versuchen erwähnt.

C. Versuche und Ergebnisse

I. Morphologische Untersuchungen und kulturelles Verhalten von Noc. hydrocarbonoxidans n. spec. (St. 70)

a. Allgemeine Charakteristik

Dieser Strahlenpilz wächst ebenfalls wie viele andere Arten (H i r s c h 1960) gut und reichlich, aber ausgesprochen langsam auf rein mineralischen Nährmedien bei Zutritt der Laborluft. Durch Petroleumdämpfe und über die Gasphase zutretende Kohlenwasserstoffe wird er sehr im Wachstum gefördert. Aber auch auf verschiedenen organischen Nährböden ist gutes Wachstum möglich.

Nie treten bewegliche Formen auf, der Organismus ist weitgehend aerob, grampositiv und läßt sich gut mit Methylenblau (Löffler), besser noch mit Karbolfuchsin (Czaplewski) anfärben. Er wächst bei pH-Werten zwischen 6.3 und 8.4, gut und unter Ausbildung von Luftmyzel nur im Bereich 6.8 bis 7.5.

Noc. hydroc. wurde 1955 als Luftverunreinigung von einer Kieselgelplatte isoliert, die mit Nitrifikationsnährlösung getränkt war.

Der günstigste Temperaturbereich für das Wachstum liegt zwischen 27 - 30°C.

Ein eigentlicher Lebenszyklus, wie er von vielen Actinomyceten bekannt ist (Autolyse nach dem 4. oder 10. Tage), konnte wohl wegen der Langsamwüchsigkeit nicht beobachtet werden. Bei längerer Kultur tritt zwar regelmäßig Autolyse ein, doch zu keinem bestimmten Zeitpunkt. Die typischen Kolonien sind regelmäßig rund, mit einer flachen Ringzone und einem Mittelhöcker (Abb. 1).

Doch treten auch abweichende Kolonieformen auf, die sich mitunter alle auf einer einzigen Agarplatte

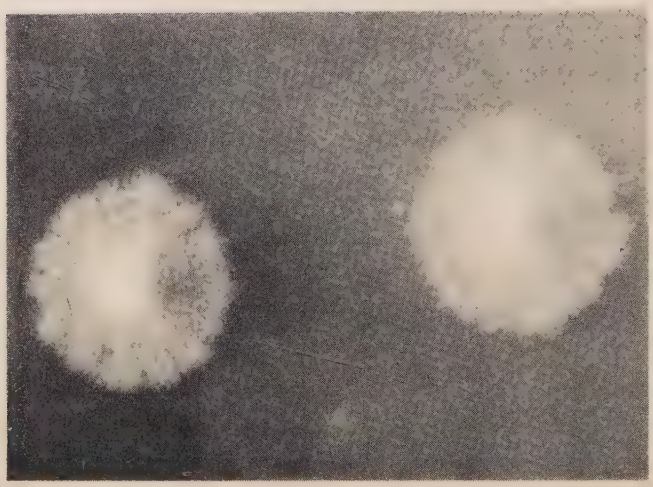

Abb. 1: Noc. hydrocarb. auf Mineralagar
nach 3 Monaten, Vergr. 7mal

finden. So kann der Mittelhöcker kraterförmig eingesenkt sein, mit einer winzigen, kegelförmigen Erhebung in der Mitte des Kraters, deren Spitze jedoch nicht die Höhe des Kraterrandes erreicht. Auch tritt, selten, am Rande der Kol. ein etwas aufgeworfener Wall auf. Schließlich können die Kol. auch einfach gebuckelt sein, was besonders bei jüngeren Flüssigkeitskulturen der Fall ist. Doch handelt es sich bei diesen Abweichungen nicht um Mutationen oder gar fremde Arten, wie mehrfache Abimpfungen bewiesen, die immer wieder zu der typischen Kolonienform führten.

Luftmyzel tritt besonders stark auf rein mineralischen Nährlösungen unter Petroleumdampf auf, es ist zunächst schneeweiß, später cremefarben. Die Lufthyphen sind 0.5 - 0.8 µ dick, meist gerade und ohne Querwände, ab und zu finden sich rechtwinklige Verzweigungen. Bemerkenswert sind auch die in den Hyphen vorhandenen metachromatischen Granula, die

sich mit Methylenblau oder Karbolfuchsin leicht anfärben lassen und auch in lebenden Hyphen im Phasenkontrast gut zu erkennen sind (Abb. 2 und 3).

Abb. 2: Noc. hydrocarb. auf Mineralsalzlösung, Luftmyzel, 84 Tage, Karbolfuchsin, Vergr. 2000x

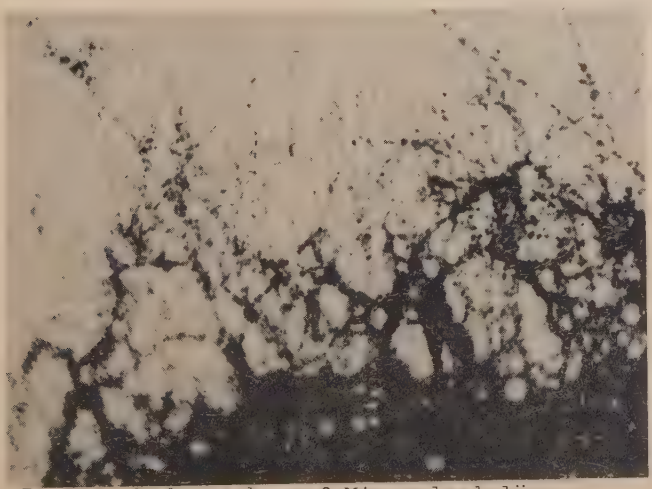

Abb. 3: Noc. hydrocarb. auf Mineralsalzlösung, 84 Tage, Karbolfuchsin, Vergr. 1400x

Wahrscheinlich handelt es sich dabei um kondensierte Phosphate, die zum großen Teil an Proteine oder Ribonucleinsäuren gebunden sind (D r e w s 1958). In späterem Stadium zerfällt das Luftmyzel in 3 - 5 µ lange Stäbchen, die dann 2 - 3 Granula enthalten (Abb. 4).

Abb. 4: Noc. hydrocarbonoxidans auf Mineralagar, Luftmyzel zu Stäbchen zerfallen, 34 Tage, Karbolfuchsin, Vergr. 1400x

Eine Bildung von echten Konidien wie bei Streptomyces konnte nie beobachtet werden. Das Substratmyzel hat dieselbe Dicke wie das Luftmyzel, ist stärker monopodial verzweigt und enthält ebenfalls Granula, deren Häufigkeit mit dem Alter der Kultur zunimmt (Abb. 5). Es treten häufiger gekrümmte oder sogar korkenzieherartig gewundene Hyphen auf. Besonders charakteristisch ist der außerordentlich leichte Zerfall zu Stäbchen von 3 - 5 µ Länge. Erwähnenswert ist noch die erhebliche Salztoleranz dieses Organismus, so wurden 2 % Magnesiumsulfat noch vertragen. Allerdings war das Wachstum verglichen mit der Standardlösung (ST) verzögert und geringer. Auch

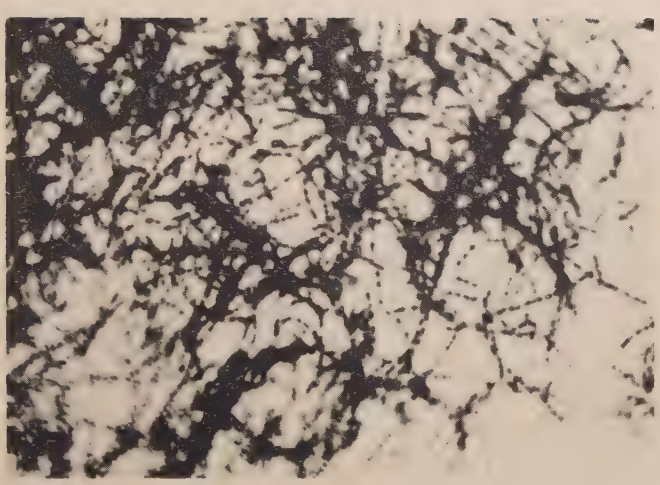

Abb. 5: Noc. hydrocarbonoxidans auf Mineralsalzlösung unter Esso-Varsol, Substratmyzel, 52 Tage, Karbolfuchsin, Vergr. 1600x

das Abweichen von der normalerweise runden Koloniefform, nämlich unregelmäßig gewölbt und gebuckelt, deutet darauf hin, daß wir uns schon hart an der Wachstumsgrenze befinden. Von einer ausgesprochen halophilen Art, wie bei dem von S z a b ó et al. (1958) isolierten Streptomyces-griseus-Stamm (Salztoleranz: über 35 % Magnesiumsulfat!) kann bei Noc. hydrocarbonoxidans also nicht die Rede sein.

Immerhin trägt diese Eigenschaft doch sicher zu ihrer großen Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung bei. So wies eine völlig eingetrocknete Kultur nach 21 Monaten noch völlig intakte Hyphen auf.

b. Spezielle kulturelle Untersuchungen

Die Angaben über die Stärke des Wachstums beziehen sich im folgenden immer auf Mineralnährlösung bzw. -agar unter sonst gleichen Bedingungen.

1) Mineralnährlösung

Wachstum gut, aber langsam. 3 - 5 Tage nach der Beimpfung treten die ersten frischen Kol. auf. Es handelt sich um reine Oberflächen-Kolonien mit weißem bis cremefarbenem Luftmyzel. In älteren Kulturen treten auch zahlreiche abgesunkene Kol. auf, die aber nicht mehr weiterwachsen. Mitunter zeigen sich viele runde, gebuckelte Einzelkolonien, die miteinander durch Hyphen zu einem Netzwerk verbunden sind. Oder die Einzelkolonien wachsen zu größeren Schollen zusammen, die nach einiger Zeit die gesamte Oberfläche der Nährlösung bedecken und sogar an der Glaswand hochziehen. Sie sind konzentrisch gezont, flach mit dem typischen Mittelhöcker (Abb. 6).

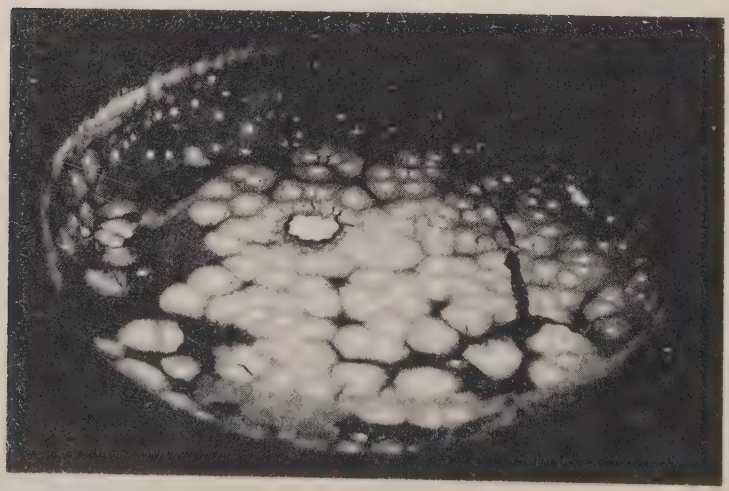

Abb. 6: Noc. hydrocarbonoxidans auf Mineralsalzlösung, 373 Tage

Das Substratmycel ist meist farblos, nur im Zentrum der Kolonienunterseite fast immer gelblich. Bei älteren Kulturen unter Petroleum wurde meistens auch eine gelbliche bis bräunliche Verfärbung der Nährlösung beobachtet. Winzige, farblos Guttationstropfen traten verschiedentlich auf. Bei Ersatz des Nitrat- durch Ammonstickstoff war weder ein fördernder noch ein hemmender Effekt zu verzeichnen.

2) Mineral-Nährlösung mit Zusatz von Na-Oxalat, Na-Acetat und Na-Formiat

Auf Oxalat Wachstum normal, Luftmycel gut ausgebildet, wattig, cremefarben.
Auf Acetat merklich verzögertes Wachstum, Luftmycel spärlich, aber mit zahlreichen Guttationstropfen. Substratmycel zunächst grauweiß, sehr dünn, später zapfenförmig mehrere Millimeter nach unten in die Nährlösung hineinragend, cremefarben.
Auf Formiat Wachstum normal, Luftmycel reichlich, reinweiß auch unter Petroleum.

3) Mineral-Nährlösung mit Zusatz von Pepton, Glukose und Stärke

Bei Peptonzusatz kaum Zuwachs festzustellen, die Kolonien sind gelbbraun verfärbt, aufgebläht und zu Boden gesunken.
Auf Stärke Wachstum etwas vermindert.
Auf Glukose Wachstum merklich gefördert, wenig Luftmycel, Substratmycel stark ausgebildet, gelblich.

4) Mineralagar

Gutes, aber langsames Wachstum. Runde Kolonien mit sehr dünner Ringzone und Mittelhöcker (s. Abb. 1), nach zwei Monaten bis zu 6 mm Durchmesser. Luftmycel reichlich, weiß bis cremefarben, matt, samtig. Substratmycel gelblich, im Zentrum der Kol. unterseits sogar gelbbraun.

5) Hefewasserbouillon

Kein Wachstum, die eingeimpften Kol. halten sich an der Oberfläche, sie sehen reichlich deformiert aus, wie aufgeblasen, beim Schütteln sinken sie zu Boden. Keine Trübung!

6) Kieselgel-Platten

Wachstum gut. Runde reinweiße, einfach gebuckelte Kol., in der Aufsicht am Rande sternförmig ausgefasert. Durchmesser meist unter 1 mm, teilweise bis zu 2 mm. Substratmycel ebenfalls reinweiß.

7) Lackmusmilch

Kein Wachstum, keine Koagulation der Milch, keine Verschiebung zum Sauren oder Alkalischen.

8) Kartoffel- und Möhrenkeil

Kein Wachstum.

9) Malzextrakt-Agar

Wachstum nur mäßig und sehr langsam. Größere unregelmäßig klumpenförmige Kol. mit zerrissener, zerklüfteter Oberfläche, gelbbraun, teilweise wie mit Mehl bestäubt. Substratmyzel faltenartig in den Agar hineinwachsend, dunkelgelbbraun bis rotbraun. Hyphen etwas aufgequollen. Durchmesser etwa 1 µ, häufig sogar blasenförmig erweitert, zahlreiche rechtwinklige Verzweigungen.

10) Calcium-Malat-Agar

Außerordentlich gutes und schnelles Wachstum. Runde Kol. mit flacher Ringzone und kleinem Mittelhöcker. Durchmesser 1-2 mm, weißgrau, später cremefarben bis zu zitronengelb, bei sehr alten Kol. Mittelhöcker sogar gelbbraun, trocken. Substratmyzel ebenfalls je nach Alter weiß bis cremefarben. Hyphen 0.6 - 0.8 µ dick, zunächst sehr lang, etwas gekrümmt und gewunden, rechtwinklig verzweigt, aber kaum Granula.

Später wenig lange Fäden, zahlreiche stäbchenförmige Bruchstücke von 3 - 5 µ Länge.

11) Gelatine

Wachstum gut, aber ziemlich langsam. Kol. rund, flach, plattenförmig, Mittelhöcker selten und dann winzig, im Alter am Rande aufgekrümmt und in der Mitte kegelförmig eingesenkt. Meistens Durchmesser unter 1 mm. Häufig mehrere Kolonien zu flachen Krusten zusammenwachsend. Luftmyzel weiß, matt, später hellbräunlich. Substratmyzel sattgelb, tief in die Gelatine hineingreifend. Nach 16 Tagen beginnende Verflüssigung. Wachstum auch in der Einstichspur der Röhrchen. Dadurch wird angezeigt, daß Noc. hydroc. unter diesen Bedingungen auch unter vermindertem Sauerstoffdruck noch zu gedeihen vermag.
Hyphen häufig schlangenförmig gekrümmt, 0.8 - 1.0 µ, dick, mit zahlreichen rechtwinkligen Verzweigungen.

12) Glukose-Agar

Wachstum gering. Runde, gewölbte, teilweise unregelmäßig geformte buckelig-höckerige Kol., dottergelb, mitunter mit dünner weißer Schicht überzogen (Luftmyzel).
Hyphen 0.8 - 1.0 µ dick, zum Teil blasenförmig erweitert, häufig zu Bruchstücken zerfallen.

13) Fleischextrakt-Pepton-Agar

Wachstum gering und langsam. Runde, buckelförmige, zunächst hell- und dann dunkelgelbe Kol., etwas feucht, 1 - 2 mm Durchmesser. Nach 40 Tagen Hyphen stark aufgequollen, teilweise blasenförmig, vielfach gekrümmt und geschlängelt, später zum großen Teil in Bruchstücke zerfallen, rechtwinklige Verzweigung selten, Hyphenbreite 1.0 - 1.2 µ.

14) Glukose-Asparagin-Agar

Schlechtes und langsames Wachstum. Runde, buckelförmig-erhabene Kol., zunächst weiß bis cremefarben,

später zitronengelb, Unterseite dottergelb. Durchmesser bis zu 1 mm nach 40 Tagen. Ältere zitronengelbe Kol. unregelmäßig gewölbt, teilweise mit aufgerissener Oberfläche. Hyphen 0.6 µ breit, ziemlich stark in Bruchstücke zerfallen.

15) Stärke-KNO_3-Agar

Wachstum gut und reichlich, Kol.-Form ähnlich wie auf Mineralagar, regelmäßig rund, konzentrische flache Ringzone und gewölbte Mittelhöcker oder auch runde, einfach gebuckelte Kol., später mit zerrissener und eingesenkter Oberfläche, weiß bis cremefarben, Mitte der Unterseite zunächst gelb, dann braun. Durchmesser 1 - 1.5 mm nach 21 Tagen.
Hyphen 0.6 - 0.8 µ breit mit zahlreichen Granula (Abb. 7).

Abb. 7: Noc. hydrocarbon. auf Stärke-KNO_3-Agar unter Esso-Varsol, 27 Tage, Karbolfuchsin, Vergr. 1400x

16) Haferflocken-Agar

Wachstum gut. Meist kreisrunde, gewölbte Kol. bis zu 1 mm Durchmesser, Luftmyzel grauweiß, später grau-braun, samtig. Substratmyzel besonders im Kol.-

Zentrum unterseits gelb bis braun.

17) Haferflocken-Glyzerin-Pepton-Agar
Gutes Wachstum. Kol. rund, konzentrisch gezont mit Mittelhöcker. Luftmyzel weiß bis hellgelb, Substratmyzel gelbbraun.

18) Glyzerin-Glykokoll-Agar
Gutes reichliches Wachstum. Zunächst buckelförmige, regelmäßig runde, weiße Einzel-Kol., später Decke aus ineinandergewachsenen, unregelmäßig klumpigen, zerklüfteten Kol., gelb bis gelbbraun. Substratmyzel dottergelb.

19) Glyzerin-KNO_3-Agar
Gutes Wachstum. Regelmäßig runde, buckelförmige Einzelkol. Üppiges weißes bis cremefarbenes Luftmyzel, teilweise aufgerissen und gelbbraunes Substratmyzel sichtbar.

c. Systematische Einordnung

Mehr als bei den Bakterien im allgemeinen liegt die Systematik der Actinomyceten noch sehr im argen. Alles ist noch im Fluß, Arten, Gattungen, ja selbst Familien werden neu geordnet. Die moderne Antibiotikaforschung der letzten Jahre hat diese bisher etwas stiefmütterlich behandelte Organismengruppe und besonders die Gattung Streptomyces Waksman und Henrici stärker in den Brennpunkt des Interesses gerückt und dadurch viel Neues und Wertvolles zutage gefördert. Überall auf der Welt wird jetzt teilweise in speziellen Instituten fieberhaft auf diesem Gebiet gearbeitet. Auf dem Internationalen Mikrobiologenkongreß 1953 in Rom, der ganz den Strahlenpilzen gewidmet war, prallten die Meinungen hart aufeinander und bis heute konnte noch keine Einigung erzielt werden. Soll die Arteinteilung vor allem auf Grund der kulturel-

len Merkmale auf synthetischen Nährböden vorgenommen werden, wie es W a k s m a n tut oder soll man sich vorwiegend wie K r a s s i l n i k o v nach der Struktur der Sporenträger und der Form der Sporen richten, das ist eine der Streitfragen (G a u s e et al. 1958, W a k s m a n 1957). Natürlich ist es von entscheidender Bedeutung, bei einer Einteilung nur möglichst konstante Merkmale zu verwenden und die variablen oder nicht eindeutig zu bestimmenden beiseite zu lassen. So halten E t t l i n g e r et al. (1958) in diesem Zusammenhang die Morphologie der Sporen und die Farbe und Morphologie des Luftmyzels für geeignet und verwerfen u.a. die Bildung antibiotischer Substanzen, die dagegen von K r a s s i l n i k o v (1959 a) als hoch spezifisch und stabil angeführt wird. Allerdings möchte er die genannte Eigenschaft nicht als Primärmerkmal, sondern zur Unterteilung von Gruppen verwenden, die sich in morphologischer und kultureller Hinsicht gleich sind. H e n s e n (1957) nennt als wichtige morphologische Merkmale, die zur Einteilung dienen können, die Entstehungsweise der Lufthyphen und die Art ihrer Umbildung in Sporenstände. Da die bisher üblichen Bestimmungsschlüssel dichotom aufgebaut sind, spielt es eine große Rolle, welches Merkmal als erstes gewählt wird. Diese Schwierigkeit umgeht W a l l h ä u s e r (1959) mit einem sehr beachtenswerten Vorschlag. Er meint, daß es richtiger sei, zunächst auf eine strenge Klassifizierung zu verzichten und sich mehr auf eine "vergleichende Systematik" zu beschränken. Dazu soll eine Lochkarten-Kartei aufgebaut werden. Jede Strahlenpilz-Art erhält eine Kartei-Karte, worauf die wichtigsten Merkmale eingelocht sind. Die Karteikarte wird zusammen mit dem Stamm in einer "Internationalen Kultursammlung" aufbewahrt. Auf diese Weise lassen sich Neuisolierungen verhältnismäßig leicht mit dem bis-

lang vorliegenden Material vergleichen und die so häufigen Doppelbeschreibungen werden vermieden. Aber leider sind wir noch nicht so weit.

Ohne Erfolg blieb der Versuch, den neu isolierten Stamm nach B e r g e y (1957) oder K r a s s i l n i k o v (1959 b) zu bestimmen. Zweifellos ist er auf Grund des Myzelzerfalls in Stäbchen zur Gattung Nocardia zu stellen. Er steht der Noc. petroleophila (H i r s c h und E n g e l 1956) und Noc. saturnea (H i r s c h 1960) sehr nahe. Doch durch die Kolonieform, besonders auf Mineralagar, den überaus leichten Zerfall des Myzels zu Stäbchen und manche kulturelle Eigenschaften, wie besseres Wachstum auf organischen Nährböden, läßt er sich klar von ihnen unterscheiden, so daß die Schaffung einer neuen Art gerechtfertigt erscheint. L i n d e n b e i n (1952) schreibt: "Jeder Untersucher von Strahlenpilzen weiß allerdings, daß ein zweimal nach demselben Rezept hergestellter Nährboden für den Strahlenpilz nicht immer derselbe ist und daß selbst bei Verwendung reinster Chemikalien noch Unterschiede auftreten können, die unter Umständen verblüffende Wirkungen hervorbringen." Bei Berücksichtigung dieser Tatsache kann man wohl sagen, daß die neue Art, wie gezeigt wurde, in ihren morphologischen und kulturellen Eigenschaften weitgehend konstant ist. Dennoch soll ihr Name nicht nach der Kolonieform oder der Farbe des Myzels gewählt werden. Wegen der für sie besonders charakteristischen Oxydation von Kohlenwasserstoffen, die wesentlich schneller als bei Noc. petroleoph. erfolgt, soll sie Noc. hydrocarbonoxidans genannt werden.

II. Physiologische Untersuchungen

a. Verwertung von Esso-Petroleum, Esso-Varsol und Esso-Solvens durch Noc. hydrocarbon.

Vorversuche in Brutschränken bei 30°C hatten erbracht, daß Kulturen von Noc. hydrocarbon. unter Esso-Petroleum schon nach kurzer Zeit ein besseres Wachstum zeigten, als Parallel-Kulturen ohne Zusatz. Nun ist eine Beurteilung des Wachstums - wie sie hier vorgenommen wurde -, die sich nur auf die mehr oder minder große Bedeckung der Nährlösungsoberfläche mit Kolonien stützt, mit mancherlei Unsicherheiten behaftet. Um eine bessere Aussage über den fördernden Effekt von Petroleum machen zu können, wurde ein Versuch in Weckgläsern angesetzt. Die hineingestellten Kulturkolben enthielten 50 ml Standard-Nährlösung (ST). Die Hälfte der Weckgläser wurde mit Penicillinfläschchen mit Esso-Petroleum versehen, die übrigen blieben ohne Zusatz. Die Beimpfung erfolgte mit einer Platinöse von einer Stammkultur, einige Kolben dienten unbeimpft als Kontrollen. Alle Weckgläser wurden bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. In der ersten Zeit schien es so, als ob die Kulturen ohne Petroleum besser gediehen, doch später zeigte sich wiederum das umgekehrte Ergebnis. Vielleicht ist die anfängliche Abweichung von den Vorversuchen darauf zurückzuführen, daß der Weckglas-Versuch bei geringerer Temperatur (ca. 20°C) durchgeführt wurde und so die beabsichtigte Petroleum-Atmosphäre sich erst nach einiger Zeit einstellte. Nach 81 Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Die Nährlösungsoberfläche der Kulturkolben unter Petroleum war gleichmäßig gut bewachsen. Die Kolonien waren gelb gefärbt. Die Parallelkulturen ohne Petroleum zeigten einen Bewuchs mit dünnen, grauweißen Kolonien, der nicht die ganze Flüssigkeitsoberfläche bedeckte (Abb. 8).

Abb. 8: Wachstum von Noc. hydrocarbon. auf Mineralsalzlösung nach 81 Tagen im Weckglas, ohne Zusatz (rechts), unter Esso-Varsol (links).

Nun wurde der Inhalt der Kulturkolben mit Kaliumpermanganat titriert. Das Ergebnis wird in Tab. 1 wiedergegeben.

Gasraum	Verbrauch an n/100 $KMnO_4$ (ml)	
	beimpft	unbeimpft
Luft	2.46	2.04
Esso-Petroleum	18.82	3.74

Tab. 1: Zuwachs von Noc. hydrocarb. auf mineral. Nährlösung unter Luft und Esso-Petroleum in Weckgläsern nach 81 Tagen, gemessen am Permanganatverbrauch.
Mittelwerte aus je 3 Parallelen.

Durch diese Werte wurde der äußere Eindruck gut bestätigt. Bei den Kulturen ohne Petroleum war, verglichen mit der Kontrolle, kaum eine Zunahme des

Kaliumpermanganat-Verbrauchs festzustellen. Dagegen war bei den Kolben, die unter Petroleum gestanden hatten, ein erheblicher Anstieg zu verzeichnen. Der erhöhte Wert der Kontrolle unter Petroleum, verglichen mit der ohne Zusatz, muß wohl auf Bestandteile des Petroleums zurückgeführt werden, die sich in der Nährlösung gelöst hatten.

Eine Aussage darüber, ob der gesteigerte $KMnO_4$-Verbrauch der Kulturen unter Petroleum wirklich nur eine Folge der angewachsenen Bakterienmasse war oder auch Bestandteile der Nährlösung dafür in Frage kamen, die ihre Entstehung der Tätigkeit der Bakterien verdankten (Stoffwechselprodukte), war auf Grund dieser Befunde nicht möglich.

Zur Klärung dieser Frage sollte der nächste Weckglasversuch verwendet werden, der gleichzeitig zur Prüfung weiterer Esso-Produkte diente. Die dazu benutzten Kulturkolben wurden mit 40 ml mineralischer Nährlösung beschickt und jeweils einer Platinöse Zellmaterial beimpft. Bei den als Kontrollen vorgesehenen Kolben wurden daraufhin die Bakterien durch Sterilisation im Autoklaven abgetötet. Als Zusätze wurden diesmal Esso-Varsol und Esso-Solvens verwandt. Dabei handelt es sich um Petroleumsorten, deren Siedepunkt-Intervall niedriger - im zweiten Fall sogar erheblich niedriger - liegt als bei Esso-Petroleum. Die Weckgläser wurden wiederum bei 20 °C in einem dunklen Schrank aufbewahrt. Weiterhin wurden zum Vergleich zur gleichen Zeit einige Kulturkolben angesetzt, die in denselben Schrank gestellt wurden, so daß die Laborluft freien Zutritt zu ihnen hatte. Die Beschickung und Beimpfung dieser Kolben erfolgte in der gleichen Weise wie bei denen in den Weckgläsern.

Dieser Versuch wurde nach 120 Tagen gestoppt. Es ergab sich folgendes Bild: Die Kolben unter Esso-Solvens zeigten kaum Zuwachs, im wesentlichen nur

eine Vergrößerung der eingeimpften Kolonien. Unter Esso-Varsol war die gesamte Nährlösungsoberfläche mit gelben, runden Kolonien bewachsen. Aber auch die Kulturkolben ohne Zusatz wiesen einen guten Bewuchs aus rein weißen, allerdings ziemlich dünnen Kolonien auf (Abb. 9).

Abb. 9: Wachstum von Noc. hydrocarbon. auf Mineralsalzlösung nach 120 Tagen im Weckglas, unter Esso-Varsol (links), ohne Zusatz (Mitte) und Esso-Solvens (rechts).

Die freistehenden Kulturen boten einen ähnlichen Anblick, nur waren die Kolonien nicht so dünn-schollig, sondern dicker. Eine Titration mit Kaliumpermanganat sollte auch in diesem Fall die rein äußerlichen Ergebnisse stützen. Dabei wurden die Nocardien z.T. durch Filtrieren mit Hilfe bakteriendichter Membranfilter abgetrennt und dann der $KMnO_4$-Verbrauch der Nährlösung allein bestimmt. Der $KMnO_4$-Wert für die Nocardien konnte dann einfach als Differenz der Angaben mit und ohne Nocardien ermittelt werden (Tab. 2).

Gasraum		Esso-Varsol	Esso-Solvens	Weckglas-luft	Labor-luft
Verbrauch an $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ (ml)	Noc. + Nährlösung	27.00	4.92 x)	3.05	9.54
	Nährlösung	20.95	2.27	1.90	4.98
	Kontrolle	2.85	2.32	2.16	3.12

Tab. 2: Zuwachs von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung unter Esso-Varsol, -Solvens und Luft in Weckgläsern oder Laborluft nach 120 Tagen, gemessen am $KMnO_4$-Verbrauch. Mittelwerte, Zahl der Parallelen 3, bei x) nur 2.

Die Kulturen unter Esso-Varsol zeigten eine erhebliche Zunahme der oxydierbaren Substanzen. Zum großen Teil sind Bestandteile der Nährlösung dafür verantwortlich, doch ist auch die Nodardien-Masse nicht unwesentlich daran beteiligt.

Unter Esso-Solvens war nur eine geringe Steigerung des $KMnO_4$-Verbrauchs zu verzeichnen, die ausschließlich auf die Bakterienmasse entfiel. Das Aussehen der Kolonien unter Esso-Solvens, das von sonstigen Flüssigkeitskulturen sehr abwich, und eher schlecht wachsenden Agar-Kolonien ähnelte, legte den Verdacht einer Schädigung der Zellen durch den zu hohen Dampfdruck nahe (Abb. 10).

So wurden einige Kolben, nachdem sie aus der Esso-Solvens-Atmosphäre herausgenommen worden waren, noch eine Zeitlang unter Laborluft gehalten. Schon nach kurzer Zeit hatten sich um die dicken, gewellten Kolonien neue grauweiße gebildet. Dadurch wurde angezeigt, daß den Nocardien zwar Esso-Solvens nicht zusagte, sie aber zumindest nicht irreversibel geschädigt worden waren.

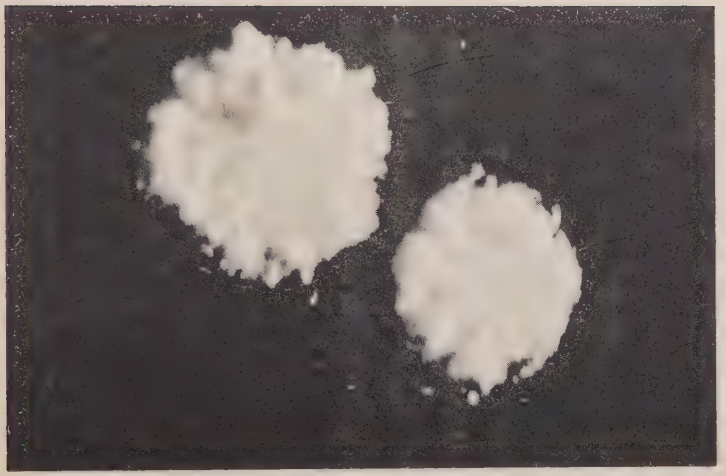

Abb. 10: Oberflächenkolonien von Noc. hydrocarbon. auf Mineralsalzlösung im Weckglas unter Esso-Solvens nach 120 Tagen.

Mit Weckglasluft allein war nur eine sehr geringe Steigerung der Oxydierbarkeit festzustellen. Bei den Kulturen unter Laborluft ist die Zunahme der oxydierbaren Substanz im Gegensatz zu den Kulturen unter Esso-Varsol zur Hauptsache der Bakterienmasse und weniger der Nährlösung zuzuschreiben.

Insgesamt läßt sich sagen: Esso-Varsol fördert das Wachstum am stärksten. Aber auch die Laborluft enthält offensichtlich wachstumfördernde Bestandteile, die bei Verbrauch laufend nachströmen können, wie sich im Vergleich mit der abgeschlossenen Weckglasluft zeigt.

b. Einfluß anderer organischer Stoffe auf das Wachstum von Noc. hydrocarbon.

Da sich herausgestellt hatte, daß Noc. hydrocarbon. auf mineralischer Nährlösung bei Zutritt der Laborluft wuchs, wurden einige weitere, fast immer in Spuren darin enthaltene Stoffe in den Kreis der

Betrachtungen einbezogen.

1) Leuchtgas und Wasserstoff

Als erstes wurde versucht, in einem Weckglas-Versuch zu ermitteln, ob Leuchtgas oder Wasserstoff eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von Noc. hydrocarbon. haben. Beide Gase wurden in einer Konzentration von 5 Vol-Prozent in die Weckgläser gegeben. Das Leuchtgas stammte aus der Gasleitung und wurde nicht besonders gereinigt. Der Wasserstoff wurde einer Gasflasche entnommen und enthielt 1 % CO_2. Die Weckgläser wurden während der ersten 35 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, danach in einen Brutschrank mit 28°C überführt. Der Versuch lief über einen Zeitraum von 5 Monaten. Seit Beginn der Bebrütung hatte der Bewuchs in allen Fällen nur noch unwesentlich zugenommen. Auf keinem Kolben trat eine dicke, geschlossene Decke aus Nocardien auf, wie bei Kulturen, die so lange einer Petroleumatmosphäre oder auch nur Laborluft ausgesetzt gewesen waren, sondern ein weitmaschiges Netzwerk von grauweißen, dünnen Kolonien überzog die gesamte Oberfläche.

Eine Titration des Kolbeninhalts mit $KMnO_4$ erbrachte folgendes Ergebnis (Tab. 3)

Gasraum	beimpft	Verbrauch an $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ (ml)
Leuchtgas	+	3.16
Wasserstoff	+	2.82
Weckglasluft	+	2.79
Weckglasluft	-	2.59 x)

Tab. 3: Zuwachs von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung unter verschiedener Gasatmosphäre nach 5 Monaten, gemessen am Permanganatverbrauch, Mittelwerte, Zahl der Parallelen 3, bei x) nur 2.

Der Mehrwert bei den Kulturen unter Wasserstoff und auch unter Leuchtgas gegenüber denen, die nur Weckglasluft ausgesetzt gewesen waren, wurde für zu gering erachtet, um daraus eine Förderung des Wachstums von Noc. hydrocarbon. durch die genannten Gase ablesen zu können. Womöglich hätte sich ein besseres Resultat ergeben, wenn die Kulturen einem kontinuierlichen Gas- und Luftzustrom ausgesetzt gewesen wären, was wegen technischer Schwierigkeiten aber nicht durchgeführt werden konnte.

2) Flüssige organische Substanzen

In einigen weiteren Weckglas-Versuchen wurde die Wirkung von Benzol, Xylol, Aceton, Toluol, n-Butanol und Pyridin in Dampfform auf das Wachstum von Noc. hydrocarbon. untersucht. Bei keinem der Zusätze war im Verlauf von 128 Tagen ein Zuwachs festzustellen. Diese Stoffe zeigen also sogar einen ausgesprochen hemmenden Effekt. Bei den beimpften Kontrollen, die keinen Zusatz erhalten hatten und somit nur der Weckglasluft ausgesetzt gewesen waren, war wiederum wie bisher eine Vermehrung mit dünnen, grauweißen Kolonien zu verzeichnen.

c. Oxydation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen und ihren Oxydationprodukten durch Noc. hydrocarbon.

1) Kohlenwasserstoffe

Die Esso-Petroleumsorten enthalten zur Hauptsache Kohlenwasserstoffe. Da aromatische Kohlenwasserstoffe zur Wachstumsförderung von Noc. hydrocarbon. wohl nicht in Frage kamen, wie die negativen Ergebnisse mit Benzol und seinen Derivaten Xylol und Toluol gezeigt hatten, außerdem H i r s c h (1958) bei Noc. petroleophila schon einen positiven Effekt von reinen aliphatischen Kohlenwasserstoffen fest-

gestellt hatte, so richtete sich nunmehr das Hauptaugenmerk auf diese Stoffklasse.

Als nächstes wurde jedoch noch geprüft, ob Esso-Varsol unter Mitwirkung der Bakterien oxydativ angegriffen wird. Dazu wurde die Warburg-Technik benutzt. Die Gewinnung einer geeigneten Zellsuspension gestaltete sich hierbei und bei späteren Versuchen folgendermaßen: Eine Anzahl von Kulturkolben, deren Nährlösungsoberfläche mit einer dichten Decke aus Nocardien bewachsen war, wurde 5-8 Tage vor Versuchsbeginn mit Hefewasser-Bouillon auf Reinheit geprüft. Der Inhalt der reinen Kolben wurde in eine mit Wattestopfen verschlossene sog. Mensnutsche (bakteriendichtes Filter aus Jenaer Glas mit angesetztem kalibrierten Glasrohr) geschüttet, die vorher sterilisiert worden war. An der Wasserstrahlpumpe wurde die Nährlösung abgesogen, mehrmals mit frischer, steriler Standardnährlösung (ST) gewaschen und zuletzt die Nocardien darin aufgenommen. Danach wurden sterilisierte Glasperlen hinzugefügt, der Wattestopfen durch einen ebenfalls sterilisierten Gummistopfen ersetzt und dann mit der Hand 15 - 30 Min. geschüttelt. Dadurch wurde eine milchig-trübe Suspension erhalten, die nur noch wenig größere Nocardien-Stükke enthielt. Hiervon wurden jeweils 3 ml in den Hauptraum der Warburg-Gefäße abpipettiert. Mit aliquoten Teilen wurde dann nach der $KMnO_4$-Methode eine Bestimmung der Zellmenge vorgenommen. In der Folgezeit erwies es sich als außerordentlich schwierig, bei aufeinanderfolgenden Versuchen zu gleichen Zellmengen zu kommen, was zu Vergleichszwecken sehr erwünscht war, obwohl die äußeren Anzucht-Bedingungen möglichst gleich gehalten wurden. Eine nachträgliche - nach der $KMnO_4$-Bestimmung - Korrektur der Zellmenge mit steriler Nährlösung wurde wegen der großen Verunreinigungsgefahr nicht durchgeführt. Denn wegen der langen Versuchsdauer (3-8 Tage!) konnte ein Hin-

zutreten von Fremdorganismen zu Beginn des Versuches nicht in Kauf genommen werden. Deshalb wurde auch stets nach Abbruch des Versuches durch Abimpfen auf Hefewasser-Bouillon und meist auch mikroskopisch die Reinheit der Suspension in den Gefäßen überprüft. Verunreinigte Parallelen, die übrigens meistens schon durch abweichende Werte auffielen, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Abweichende Werte ergaben sich auch bei starker Änderung des pH-Wertes während des Versuches, was immer durch Überkriechen des Karbonatpuffers in den Hauptraum bedingt war. Auch diese Parallelen wurden ausgeschieden.

Als maßgebliche Größe beim Vergleich verschiedener Versuche wurden die Q_{O_2}-Werte benutzt, deren Definition lautet: O_2-Verbrauch je Stunde und mg Bakterientrockensubstanz.

Um einen weiteren Anhaltspunkt für den Vergleich verschiedener Versuche zu haben, wurde noch die Größe Q_T eingeführt, worunter das Verhältnis von Substratatmung zur endogenen Atmung zu einer bestimmten Zeit (T) verstanden wird. Unter der Voraussetzung, daß bei einer Vermehrung der Zellmenge die Substratatmung im gleichen relativen Maße ansteigt wie die endogene Atmung, was aber natürlich nicht ohne weiteres gesagt ist, ergibt sich ein durchaus geeigneter Vergleichsmaßstab.

Nun zurück zum Warburg-Versuch mit Esso-Varsol. Der Hauptraum der Gefäße enthielt wie erwähnt 3 ml Suspension. Im Mitteleinsatz befanden sich 0.3 ml Karbonatpuffer (M Na_2CO_3 : M $NaHCO_3$ = 4 : 1), wodurch ein konstanter CO_2-Druck gewährleistet war und eine Druckabnahme als O_2-Verbrauch interpretiert werden konnte. Allerdings muß sich vorher der für die Arbeitstemperatur von 30°C gültige Dampfdruck des Esso-Varsols eingestellt haben, was durch einen ausreichenden Temperaturausgleich nach Einhängen der

Gefäße ins Wasserbad erreicht wurde. Einige Gefäße enthielen in einer Seitenbirne 0.3 ml Esso-Varsol, die übrigen blieben ohne Zusatz und dienten zur Messung der endogenen Atmung. Das Ergebnis des Versuches ist in Abb. 11 dargestellt.

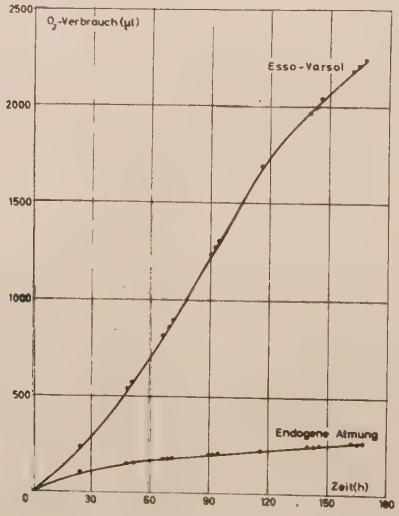

Abb. 11: Oxydation von Esso-Varsol durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 63 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspen.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz::0.3 ml Esso-Varsol (Substratoxydation, 4 Parallelen) oder leer (end. Atmung, 3 Parallelen)

Die Oxydationsgeschwindigkeit war bei Esso-Varsol-Zusatz sehr gefördert. Die Kurve des O_2-Verbrauchs zeigt in der ersten Zeit eine Aufkrümmung, verläuft dann gradlinig und krümmt zuletzt wieder ab. Die Aufkrümmung, die übrigens bei Noc. petroleoph. niemals festgestellt werden konnte (H i r s c h 1958), kann wohl als ein Anzeichen

für Wachstum gewertet werden, was nach den Ergebnissen der Weckglas-Versuche auch erwartet werden durfte. Auffallenderweise ließ sich mit der $KMnO_4$-Methode nicht - wie erhofft - eine Zunahme der Zellsubstanz nachweisen. Die Deutung einer adaptiven Enzymbildung, die auch eine Aufkrümmung erklären würde, konnte ausgeschaltet werden, da die Zellen ja unter Esso-Varsol vorkultiviert worden waren. Auch für die Gefäße ohne Esso-Varsol war zuerst ein merklicher O_2-Verbrauch zu verzeichnen, der aber nach einiger Zeit schwächer wurde. Diese Erscheinung wurde auch bei den folgenden Warburg-Versuchen mit verschiedenen anderen Substraten immer wieder gefunden. Sie wurde als Veratmung zelleigener Substanzen gedeutet und als "endogene Atmung" bezeichnet. Der Versuch, auch mit Esso-Solvens einen Warburg-Versuch durchzuführen, schlug fehl, da sich bei dieser niedrig siedenden Petroleumsorte und einer Wasserbadtemperatur von 30°C auch nach vielen Stunden kein konstanter Dampfdruck einstellte, so daß manometrisch kein O_2-Verbrauch gemessen werden konnte.

Mit den zur Verfügung stehenden, bei 30°C flüssigen, gradkettigen Kohlenwasserstoffen (C_6 - C_{14} und C_{16}) wurden zahlreiche Versuche meist in der Warburg-Apparatur durchgeführt. Wenn nichts anderes erwähnt wird, wurde dazu die Beschickung der Gefäße so vorgenommen: Der Hauptraum erhielt 3 ml Suspension, in den Mitteleinsatz kamen 0.3 ml Karbonatpuffer und in eine Seitenbirne einiger Gefäße 0.05 ml des zu prüfenden Kohlenwasserstoffs. Stets lief bei den Versuchen ein Gefäß mit, das zwar Kohlenwasserstoff, aber anstelle der Suspension 3 ml Aqua dest. enthielt. Dadurch konnte einmal kontrolliert werden, wann sich der Dampfdruck des betreffenden Kohlenwasserstoffs eingestellt hatte. Dieser Zeitpunkt wurde als Versuchsbeginn (Zeit 0) gewählt. Andererseits gab dieses Gefäß auch Aufschluß über eine Selbstoxydation

der Testsubstanz. Gegebenenfalls wurde dann der O_2-Verbrauch der Bakterien korrigiert, wobei angenommen wurde, daß die Selbstoxydation in den Gefäßen mit Bakterien genauso groß war wie im Kontrollgefäß.

Warburg-Versuche mit den verfügbaren paraffinischen Kohlenwasserstoffen erbrachten eine mehr oder minder große Förderung der O_2-Aufnahme. Die Ergebnisse einiger Versuche sind in den Abb. 12 - 17 dargestellt.

Die Kurven vom Octan bis zum Dodecan zeigen von vornherein eine merkbare Aufkrümmung. Beim Tri- und Tetradecan tritt diese Tendenz erst nach einer längeren Anlaufzeit auf und beim Hexadecan schließlich ist sie überhaupt nicht auszumachen.

Da alle Zellen unter Esso-Varsol angezogen worden waren, in dem die fraglichen Kohlenwasserstoffe wohl vorkommen, wurde die hierfür mögliche Deutung einer Enzymneubildung fallengelassen und stattdessen Zellwachstum (also Enzymvermehrung) angenommen. Als Stütze für diese Annahme läßt sich anführen, daß sich in mehreren Fällen in den Warburg-Gefäßen mit den Kohlenwasserstoffen während der Versuche an der Grenze zwischen Suspension und Luftraum an der Glaswand die Bildung eines weißen Häutchens beobachten ließ. Eine mikroskopische Überprüfung ergab einwandfrei, daß es sich bei diesem Häutchen um neue Nocardia-Hyphen handelte. Mehrmals konnte sogar eine geschlossene Oberflächendecke aus Nocardia-Zellen in den Reaktionsgefäßen festgestellt werden.

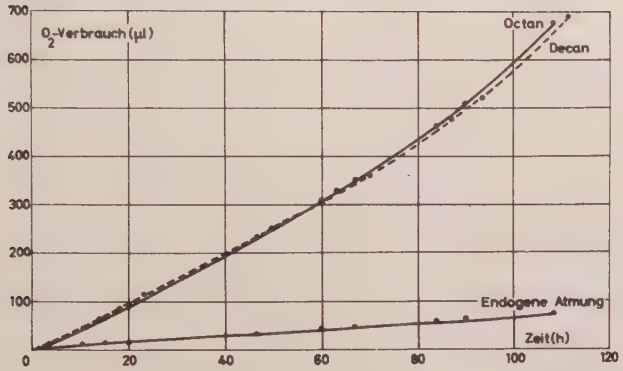

Abb. 12: Oxydation von Octan und Decan durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 24 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Kohlenwasserstoff (Substratoxyd. je 4 Parallelen) oder leer (end. Atm., 2 Parallelen)

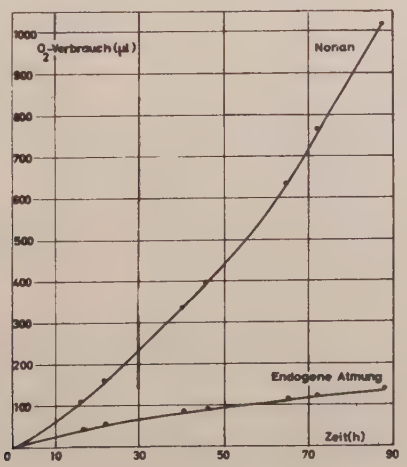

Abb. 13: Oxydation von Nonan durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 51 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert. - Hauptraum: 3 ml Susp.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Nonan (Substratoxyd) oder leer (end. Atm.) Mittelwerte aus je 3 Parall.

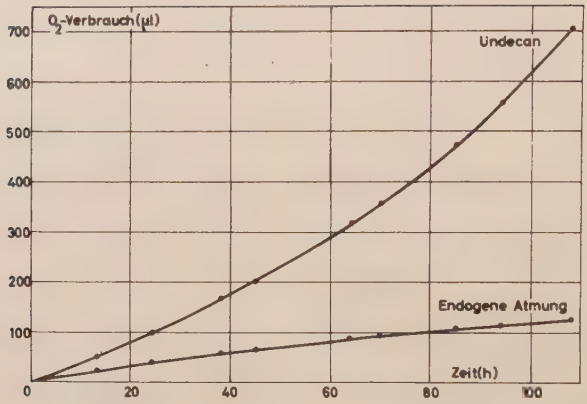

Abb. 14: Oxydation von Undecan durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 60 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Susp.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Undecan (Substratoxyd.) oder leer (end. Atm.), Mittelwerte aus je 3 Parallelen.

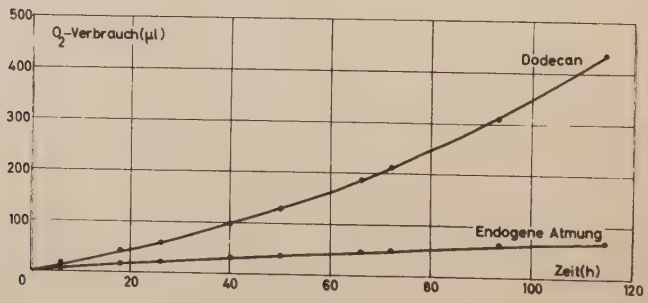

Abb. 15: Oxydation von Dodecan durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 43 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Susp.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Dodecan (Substratoxyd.) oder leer (end. Atm.), Mittelwerte aus je 3 Parallelen.

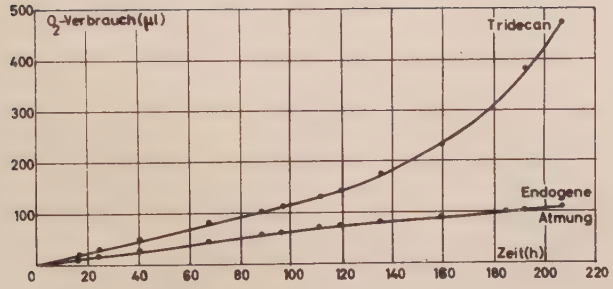

Abb. 16: Oxydation von Tridecan durch Noc. hydrocarbon. - Zellmaterial 51 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Susp.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Tridecan (Substratoxyd.) oder leer (end. Atm.), Mittelwerte aus je 3 Parallelen.

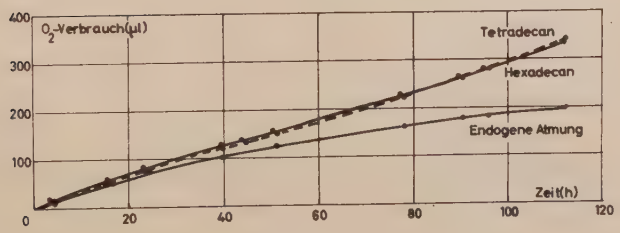

Abb. 17: Oxydation von Tetra- und Hexadecan durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 41 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Susp.
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Tetradecan (3 Gefäße)
0,05 ml Hexadecan (4 Gefäße)
oder leer (end. Atm., 3 Parall.)

Die folgende Tab. 4 bringt eine Zusammenstellung der Q_{O_2} - und Q_T-Werte von Warburg-Versuchen mit Kohlenwasserstoffen.

Kohlenwasserstoff	Menge (ml)	Alter der Zellen	Q_{O_2}	Q_{50}
Octan	0.05	24	7.5	4.0
Nonan	0.05	51	8.2	4.7
Decan	0.05	24	7.5	6.7
Undecan	0.10	60	5.4	3.1
Dodecan	0.05	43	6.0	3.2
Tridecan	0.05	51	2.9	1.8
Tetradecan	0.05	41	2.6	1.2
Hexadecan	0.05	41	2.6	1.3

Tab. 4: Oxydation von Kohlenwasserstoffen durch Noc. hydrocarbon.
Q_{O_2} = O_2-Verbrauch (µl) je Stunde und mg Bakterientrockensubstanz
Q_{50} = Quotient aus Substratoxydation und endogener Atmung 50 Stunden nach Versuchsbeginn.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die niederen Kohlenwasserstoffe Octan, Nonan und Decan gut, Undecan und Dodecan bereits schwächer und Tri-, Tetra- und Hexadecan nur noch mäßig durch Noc. hydrocarbon. oxydiert werden. Es ist durchaus möglich, daß diese schwächer werdende Oxydation mit steigender Kettenlänge einfach eine Folge des in gleicher Richtung geringer werdenden Dampfdrucks der Kohlenwasserstoffe ist.

Wegen der niedrigen Siedepunkte von Hexan und Heptan war im Warburg-Versuch der Nullpunkt der Messung nicht zu ermitteln, und auch im weiteren Verlauf ergaben sich unterschiedliche, stark schwankende Werte. So wurde auch diesmal auf die Weckglas-Technik zurückgegriffen.

Wie gewöhnlich wurden die 100-ml-Weithals-Erlenmeyer-Kolben mit 40 ml Nährlösung (ST) beschickt. Die verschlossenen Weckgläser wurden im Brutschrank bei 20°C gehalten. Schon nach 4 Tagen war überall leichtes Wachstum festzustellen. Doch schien es so, als ob die Kolben unter Hexan und Heptan gegenüber den Kontrollen ohne Zusatz etwas zurückgeblieben waren. Doch später - nach 45 Tagen - hatte sich dieser erste Eindruck verschoben. Die Kolben mit Hexan hatten alle eine geschlossene Decke aus gelblich-weißen Nocardien, außerdem fanden sich sehr viele abgesunkene Einzelkolonien am Grund der Kolben. Bei den Kulturen unter Heptan war die auftretende Decke aus grauweißen Oberflächenkolonien nicht völlig geschlossen. Auch hier traten viele abgesunkene Kolonien auf. Die Kolben ohne Zusatz waren dagegen nur mäßig, mit dünnen durchscheinenden Kolonien bewachsen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Kolben bot sich folgender Anblick:

Hexan: Klumpen von stark verflochtenen Hyphen, wenig zerfallen, an einigen Stellen stark elliptisch aufgebläht.

Heptan: Hyphen noch stärker vernetzt und verflochten, nur vereinzelt blasenförmige Erweiterungen.

Ohne Zusatz: normale, wenig verzweigte Hyphen. Auf Druck in stäbchenförmige Bruchstücke zerfallend.

Eine Titration mit $KMnO_4$ sollte eine Bestätigung und Vertiefung des äußeren Ergebnisses liefern (Tab.5).

Gasraum	Hexan			Heptan			Weckglasluft		
Verbrauch an n/100	Noc.+ Nährlsg.	Nährlsg.	Kontr.	Noc.+ Nährlsg.	Nährlsg.	Kontr.	Noc.+ Nährlsg.	Nährlsg.	Kontr.
$KMnO_4$ (ml)	37.75	11.06	3.84	27.40	12.10	3.58	3.18	2.83	2.89

Tab. 5: Zuwachs von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlös. unter Hexan, Heptan und Luft in Weckgläsern nach 45 Tagen. Mittelwerte, Zahl der Parallelen 2 - 3.

Es ergab sich ein ähnliches Bild wie unter Esso-Varsol. Unter dem Einfluß dieser niedrigen Kohlenwasserstoffe wurden von den Bakterien erhebliche Mengen organischer Substanz gebildet. Unter Hexan ist der Gewinn noch stärker als unter Heptan. Dieser Mehrgewinn entfällt vor allem auf die Bakteriensubstanz, die bei Kultur unter Hexan, aber auch noch Heptan im Gegensatz zu Esso-Varsol eine wesentlich größere Zunahme aufweist als die organischen Bestandteile der Nährlösung (Stoffwechselprodukte).

Wahrscheinlich beruht der Unterschied in der Zunahme-Verteilung zwischen diesen Kohlenwasserstoffen und Esso-Varsol auf den ganz verschiedenen Zeiten der Versuchsdauer von 45 bzw. 120 Tagen. Zunächst wird Zellmaterial neu gebildet, später setzt dann auch ein Abbau ein. Nach 4 Monaten ist die Autolyse der Nocardien-Zellen schon weit fortgeschritten, womit sich die erhaltenen Resultate zwanglos erklären lassen.

Einige weitere Weckglas- und Exsikkatorversuche mit Decan sollten diese Ansicht stützen. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Gasraum			Decan		
Verbrauch an n/100 $KMnO_4$ (ml)	Anzucht-gefäß	Kultur-dauer	Noc. + Nährlsg.	Nährlö-sung	Kontr.
	E	70	30.98	11.13	5.26
	W	23	10.43	4.05	3.56
	E	22	13.28	3.94	3.54

Tab. 6: Zuwachs-Verteilung von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung unter Decan in Weckgläsern (W) oder Exsikkatoren (E) in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte, Zahl der Parallelen 2 - 6.

Tatsächlich ergab sich eine volle Bestätigung: Die Zunahme der oxydierbaren Substanz geht bei den geringen Anzuchtzeiten fast vollständig auf die Bakterienmasse zurück. Bei längerer Kulturdauer muß ein beträchtlicher Teil der Steigerung der Nährlösung zugeschrieben werden.

2) RQ-Werte bei Oxydation von Undecan und Tridecan

Durch die Oxydation der Kohlenwasserstoffe wird einmal Energie gewonnen, mit deren Hilfe Noc. hydrocarbon. möglicherweise Zellmaterial aufbaut. Andererseits werden vielleicht Oxydationsprodukte gebildet, die assimiliert werden.

Zur Klärung dieser Fragen wurde sodann versucht, etwas über den Abbauweg der Kohlenwasserstoffe in Erfahrung zu bringen. Das geschah zunächst durch Ermittlung der RQ-Werte.

Wenn man annimmt, daß die Kohlenwasserstoffe vollständig zu CO_2 und H_2O abgebaut werden, so hat der Respirationsquotient RQ (CO_2/O_2) den Wert 0,65 nach der Gleichung:

$$C_{11}H_{24} + 17\ O_2 = 11\ CO_2 + 12\ H_2O$$

Die experimentellen RQ-Werte wurden folgendermaßen gewonnen. Jeder Versuch umfaßte 13 Reaktionsgefäße,

die folgendermaßen beschickt wurden: Von 4 Gefäßen mit 3 ml Suspension im Hauptraum und 0.3 ml Karbonatpuffer in der Seitenbirne dienten 2 mit 0.05 ml Kohlenwasserstoff im Mitteleinsatz zur Messung der Substratoxydation und 2 ohne Zusatz zur Bestimmung der endogenen Atmung. Ein Reaktionsgefäß mit Karbonatpuffer und Kohlenwasserstoff, aber 3 ml H_2O statt der Suspension, wurde wie üblich zur Kontrolle der Selbstoxydation verwandt. Die übrigen 8 Gefäße bekamen statt des Karbonatpuffers 0.3 ml H_2SO_4 (10 %), 3 ml Suspension und 4 davon 0.05 ml Kohlenwasserstoff, die übrigen 4 blieben ohne Zusatz.

17 - 43 Stunden nach Versuchsbeginn wurde in je 2 Gefäßen durch Zukippen der Säure in den Hauptraum das gebundene CO_2 bei Kohlenwasserstoff-Gabe und ohne Zusatz bestimmt (Anfangs-CO_2). Nach weiteren 70 - 90.5 Stunden erfolgte die Säurezugabe in den übrigen 4 Gefäßen (End-CO_2). Das im Luftraum vorhandene freie CO_2 wurde bei der Bestimmung der RQ-Werte nicht berücksichtigt. Aus den Untersuchungen von B a r d i und B o r e t t i (1958) mit Nocardia rugosa muß man schließen, daß die endogene Atmung bei Gegenwart eines äußeren Substrates zumindest stark herabgesetzt ist. Es ist ja ohne weiteres verständlich, daß der Organismus seine Reservesubstanzen so lange nicht oder nur in geringem Maße angreift, wie ihm eine Energiequelle von außen angeboten wird. Dann muß aber eine Korrektur der Substratoxydation durch einfache Subtraktion des O_2-Verbrauchs der endogenen Atmung zu falschen Werten führen. So wurde bei der Ermittlung der RQ-Werte (Tab. 7) darauf verzichtet.

Die RQ-Werte der Kohlenwasserstoffe schwanken recht erheblich, sie liegen mit einem Mittelwert von 0.20 weit unter dem theoretischen Wert von 0.65 für den völligen Abbau. Aus den niedrigen Werten kann man lediglich schließen, daß der Abbau un-

vollständig ist und bei einem sauerstoffreichen Zwischenprodukt stehenbleibt, das vielleicht assimiliert wird oder auch in der Nährlösung liegenbleibt.

Alter des Zellmaterials d	Versuchsdauer h	Substrat	O_2-Verbrauch (µl)	Gebunden. CO_2 (µl) Anfang	Gebunden. CO_2 (µl) Ende	CO_2-Abgabe (µl)	RQ (CO_2/O_2)
37	70	Undecan	498.6	43.7	115.7	72.0	0.14
		Kontr.	48.6	35.2	56.3	21.1	0.43
44	90.5	Undecan	257.5	39.8	89.7	49.9	0.19
		Kontr.	49.4	30.2	52.3	22.1	0.40
29	73	Tridecan	233.3	52.3	118.4	66.1	0.28
		Kontr.	70.3	50.3	69.2	18.9	0.27

Tab. 7: RQ-Werte von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung unter Kohlenwasserstoff-Atmosphäre.

Die RQ-Werte der endogenen Atmung sind mit einem Mittelwert von 0.37 zwar größer, aber ebenfalls noch verhältnismäßig niedrig. Einen Rückschluß auf die Art der veratmeten, zelleigenen Stoffe lassen sie nicht zu.

Nachdem die Bestimmung der RQ-Werte nur wenig Aufschluß über die Art der Oxydation der Kohlenwasserstoffe erbracht hatte, wurde versucht, die Frage auf andere Weise zu klären. Wenn der erste Angriff an einer endständigen Methylgruppe erfolgt - was natürlich nicht sicher ist - so kann die Oxydation nach folgendem Schema über die Alkohole und Aldehyde bis zur Säure fortschreiten, die dann in Form der ß-Oxydation weiterverarbeitet wird:

$C_nH_{2n+1} \cdot CH_3 + 1/2\ O_2 \rightarrow C_nH_{2n+1}\ CH_2\text{-}OH - 2\ H \rightarrow$
$C_nH_{2n+1}CH{=}O + 1/2\ O_2 \rightarrow C_nH_{2n+1}COOH$

Da das andere Ende der Kette ebenfalls aus einer Methylgruppe besteht, kann auch dort eine Oxydation stattfinden, so daß auch Dicarbonsäuren zu erwarten sind (ω-Oxydation).

Wenn dieses Schema zutrifft, müssen die Zwischenprodukte (Alkohole, Aldehyde und Säuren) genau wie die Kohlenwasserstoffe durch Noc. hydrocarbon. oxydiert werden können. Es wurden daher die mutmaßlichen Intermediärverbindungen in den nächsten Experimenten untersucht. Allerdings liefert ein positiver Ausgang noch keinen schlüssigen Beweis, wohl aber erhöht sich die Wahrscheinlichkeit dafür, daß der Abbau wirklich so vor sich geht.

3) Alkohole

In Warburg-Versuchen wurde geprüft, ob Noc. hydrocarbon. die einwertigen, gesättigten, primären Alkohole der Kettenlänge C_6 - C_{12} oxydiert. Die Versuchsanordnung und Beschickung der Reaktionsgefäße war die gleiche, die bei den Kohlenwasserstoffen beschrieben wurde. Die Alkohole standen also auch - wie die Kohlenwasserstoffe - nicht in direktem Kontakt mit der Suspension und damit den Bakterien, sondern konnten nur über die Gasphase zu ihnen gelangen.

Alle getesteten Alkohole wurden von Noc. hydrocarbon verwertet, Undecyl- und Laurinalkohol allerdings kaum feststellbar, das Ausmaß des O_2-Verbrauches ist in den Kurven der Abb. 18 - 21 wiedergegeben.

Die Kurven für Hexyl- und Heptylalkohol steigen in den ersten 20 Stunden gradlinig an, krümmen dann ab, diese Tendenz setzt sich fort, zuletzt ist der O_2-Verbrauch der Gefäße mit Alkohol nur wenig größer als derjenigen ohne Zusatz (endogene Atmung)

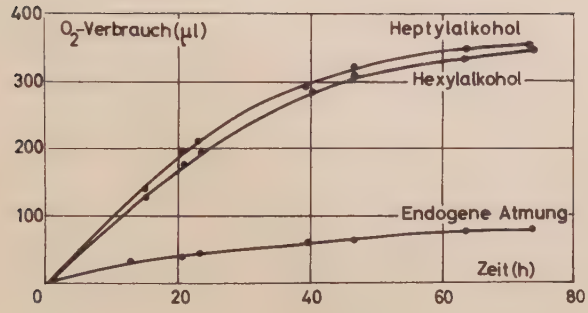

Abb. 18: Oxydation von Hexyl- und Heptylalkohol durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 95 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Alkohol (Substrat-oxyd.) oder leer (end. Atmung)
Mittelwerte aus je 2 Parallelen.

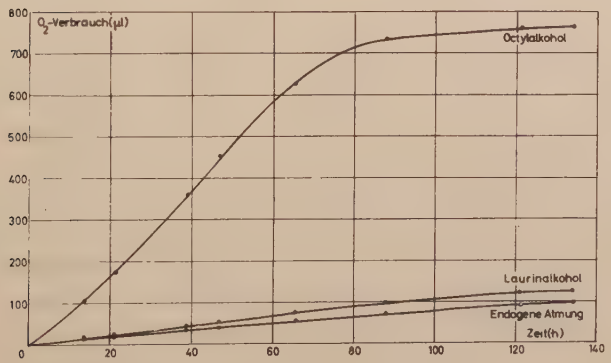

Abb. 19: Oxydation von Octyl- und Laurinalkohol durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 33 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Alkohol (Substrat-oxyd. je 3 Parallelen)
oder leer (endog. Atm., 5 Parallelen)

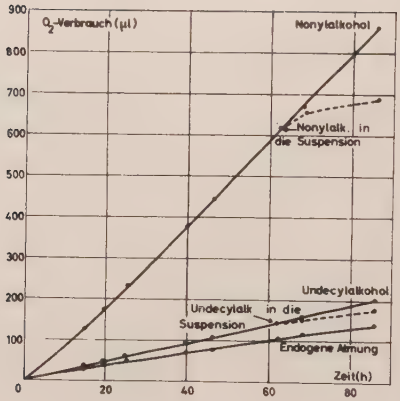

Abb. 20: Oxydation von Nonyl- und Undecylalkohol durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 75 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Alkohol (Substratoxyd., je 4 Parallelen)
oder leer (end. Atm., 3 Parallelen)

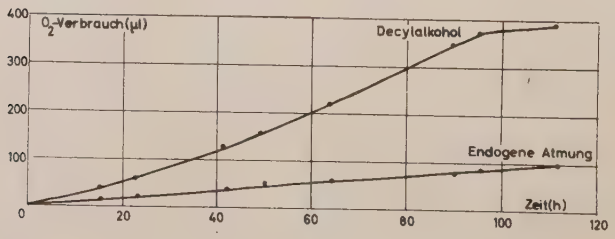

Abb. 21: Oxydation von Decylalkohol durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 41 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Decylalkohol (Substratoxyd., 3 Parallelen)
oder leer (end. Atm., 5 Parallelen)

(Abb. 18). Dieser Befund legt den Verdacht einer Schädigung des oxydierenden Enzymsystems oder gar der Zellen überhaupt nahe. In einem Weckglasversuch mit Hexyl- bzw. Heptylalkohol-Atmosphäre war kein Wachstum zu verzeichnen, auch dann nicht, als die Kulturkolben nach Abbruch des eigentlichen Versuches aus den Weckgläsern herausgenommen wurden und unter Laborluft standen. Im mikroskopischen Bild erwiesen sich die Hyphen der eingeimpften Kolonien unter Hexyl- oder Heptylalkohol als stark deformiert. Alles dies spricht für eine irreparable Schädigung der Zellen.

Auch bei den höheren Alkoholen ist eine Abkrümmung der Kurven zu verzeichnen, die mit steigender Kettenlänge immer später auftritt (Abb. 19 u. 21). Bei Nonyl- und Undecylalkohol ist allerdings die Abkrümmung wahrscheinlich wegen der verhältnismäßig kurzen Zeitdauer der Versuche nicht auszumachen, nur als die Alkohole direkt in die Suspensionen gekippt wurden, stellte sie sich sofort ein (Abb.20). Es ist wohl berechtigt, auch hier eine Schädigung des oxydierenden Enzymsystems anzunehmen, deren Ursache vielleicht der unmittelbare Kontakt der Zellen mit den Alkoholen ist.

Beim Octyl- und Decylalkohol ist nach Beginn des Versuches zuerst eine leichte Aufkrümmung wahrzunehmen. Interessant ist im Zusammenhang damit, daß in diesen Versuchen ein Bewuchs mit Nocardien auf der Oberfläche der Suspension in den Reaktionsgefäßen auftrat. So kann man die Aufkrümmung als Zeichen für Wachstum interpretieren.

Die folgende Tabelle 8 bringt eine Zusammenstellung der Q_{O_2}- und Q_T-Werte.

Alkohol	Menge (ml)	Alter der Zellen (d)	Q_{O_2}	Q_{50}
Hexyl-	0.05	95	6.2	4.6
Heptyl-	0.05	95	6.3	4.8
Octyl-	0.05	41	6.1	8.3
Nonyl-	0.05	75	6.6	5.6
Decyl-	0.05	51	6.4	4.8
Undecyl-	0.05	75	1.6	1.4
Laurin-	0.05	33	1.6	1.4

Tab. 8: Oxydation von Alkoholen durch Noc. hydrocarb.

Q_{O_2} = Oxydationsgeschwindigkeit pro mg Bakterientrockensubstanz $\left(\frac{\mu l}{h \cdot mg}\right)$

Q_{50} = Verhältnis von Substratoxydation zu endogener Atmung 50 Std. nach Beginn des Versuches.

Es ist also vom Hexyl- bis zum Decylalkohol eine gute Oxydation durch Noc. hydrocarbon. zu verzeichnen, dagegen ist sie beim Undecyl- und Laurinalkohol erheblich schwächer, was vielleicht auf ihren viel geringeren Dampfdruck zurückgeführt werden kann.

4) RQ-Wert bei Oxydation von Dekanol

Mit einem der Alkohole (Dekanol) wurde der Respirationsquotient bestimmt. Versuchsanordnung und -durchführung waren die gleichen wie bei den Versuchen mit Kohlenwasserstoffen. In der Tab. 9 sind die erhaltenen werte wiedergegeben.

Alter des Zell-materials (d)	Ver-suchs-dauer (h)	Substrat	O_2-Ver-brauch (µl)	Gebunden. CO_2 (µl) Anfang	Gebunden. CO_2 (µl) Ende	CO_2-Abgabe (µl)	RQ (CO_2/O_2)
39	71.5	Dekanol	291.6	7.7	141.1	133.4	0.46
		Kontr.	36.8	21.7	34.2	12.5	0.34

Tab. 9: RQ-Wert von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung unter Dekanol-Atmosphäre.

Nach der Gleichung

$$C_9H_{19}\cdot CH_2\text{-}OH + 15\ O_2 = 10\ CO_2 + 11\ H_2O$$

ergibt sich für die vollständige Oxydation von Dekanol zu Kohlendioxyd und Wasser ein RQ-Wert von 0.66. Das ermittelte Ergebnis von 0.46 bleibt zwar hinter dem theoretischen zurück, aber lange nicht so viel wie bei den Kohlenwasserstoffen (Theorie 0.65, Praxis 0.20). Dies Resultat entspricht durchaus der Erwartung; denn der Alkohol ist - zieht man seine Entstehung durch O_2-Aufnahme aus dem Kohlenwasserstoff in Betracht - dem dort vermuteten, sauerstoffreichen Zwischenprodukt schon einen Schritt näher gerückt.

Der RQ-Wert von 0.34 für die endogene Atmung fügt sich den bisher erhaltenen gut ein.

5) Aldehyde

Auch die Aldehyde wurden mit der Warburg-Technik getestet. Im Hauptraum befanden sich 3 ml Suspension, im Mitteleinsatz 0.3 ml Karbonatpuffer und im Seitenansatz schließlich 0.05 ml der zu prüfenden Aldehyde. In den Abb. 22 - 24 sind einige dieser Versuche aufgezeichnet.

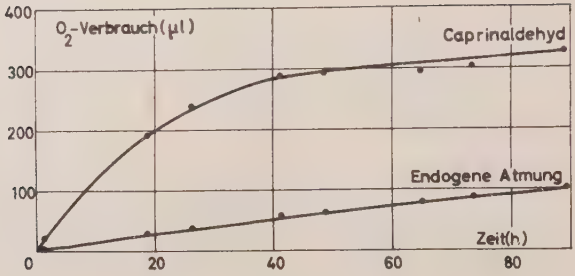

Abb. 22: Oxydation von Caprinaldehyd durch Noc. hydrocarbon. - Zellmaterial 87 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Caprinaldehyd (Substratoxyd., 3 Parallelen)
oder leer (End. Atm., 2 Parallelen)

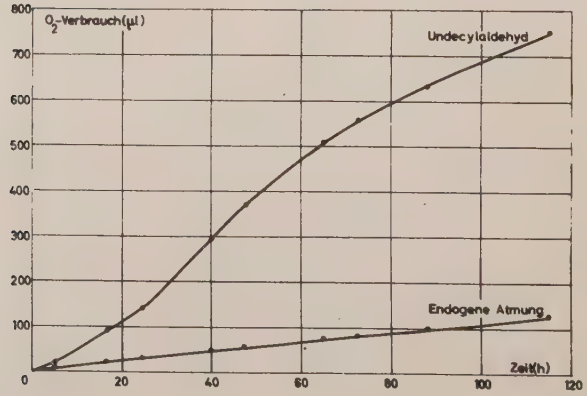

Abb. 23: Oxydation von Undecylaldehyd durch Noc. hydrocarbon. - Zellmaterial 55 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Undecylaldehyd (Substratoxyd.) oder leer (end. Atm.)
Mittelwerte aus je 3 Parallelen.

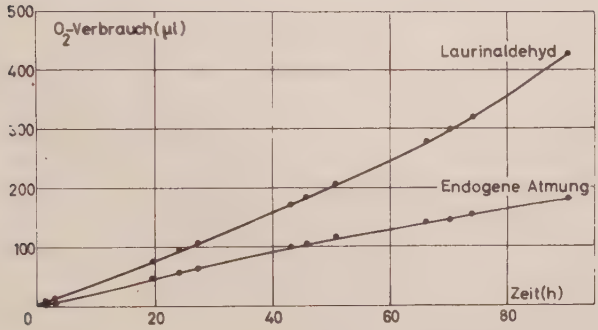

Abb. 24: Oxydation von Laurinaldehyd durch Noc. hydrocarbon.
Zellmaterial 65 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspenion
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Seitenansatz: 0.05 ml Laurinaldehyd (Substratoxyd.)
oder leer (end. Atm.)
Mittelwerte aus je 4 Parallelen.

Leider ist die Selbstoxydation der Aldehyde, besonders der kürzerkettigen, sehr hoch. Sie wurde immer im Kontrollgefäß ohne Bakterien ermittelt und von den Werten abgezogen, die sich bei den Gefäßen mit Bakterien und Aldehyden ergaben. Infolgedessen ließ sich eine fördernde Wirkung der Bakterien bei Capron-, Oenanth- und Caprylaldehyd nicht nachweisen. Beim Caprinaldehyd war ein erhöhter O_2-Verbrauch, der durch die Tätigkeit der Bakterien bedingt war, nur etwa in den ersten 40 Stunden zu verzeichnen (Abb. 22).

Lediglich beim Undecyl- und Laurinaldehyd zeigte sich eine eindeutige Förderung der Oxydation während der ganzen Dauer der Versuche, was zu aufkrümmenden Kurven führte (Abb. 23 u. 24). Im Einklang damit steht, daß die Oberfläche der Suspension der Gefäße mit Laurinaldehyd am Ende des Versuches mit

einer geschlossenen Decke aus Nocardien bewachsen war und beim Undecylaldehyd sich an der Grenze zwischen Suspension und Luftraum an der Glaswand Ansätze einer Neubildung von Nocardienzellen fanden.

In einem Weckglas-Versuch mit Capron- und Oenanthaldehyd konnte kein Wachstum von Noc. hydrocarbon. festgestellt werden, auch dann nicht, als die Kulturkolben nach 18 Tagen aus den Weckgläsern herausgenommen und unter Laborluft noch einige Zeit gehalten wurden. Offenbar übten diese niederen Aldehyde einen toxischen Einfluß auf die Zellen von Noc. hydrocarbon. aus.

6) Säuren

Der Arbeitshypothese folgend wurden auch die entsprechenden Monocarbonsäuren (C_6 - C_{14}) und zwei Dicarbonsäuren (C_4 und C_{10}) auf oxydative Verarbeitung durch Noc. hydrocarbon. in der Warburg-Apparatur getestet.

Es war nicht möglich, in der bisherigen Weise mit der Testsubstanz im Seitenansatz zu arbeiten. Der Dampfdruck der Säuren ist wohl zu niedrig, so daß keine erhöhte Oxydation gemessen werden konnte. Daraufhin wurde die Säure aus der Seitenbirne in den Hauptraum gekippt, um so einen direkten Kontakt zwischen Säure und Suspension zu erreichen, wodurch der O_2-Verbrauch aber augenblicklich zum Stillstand kam. Eine Überprüfung ergab, daß der pH-Wert in diesen Gefäßen auf etwa 5 abgesackt war.

Nun wurden Lösungen der Natriumsalze der Säuren mit Phosphatpuffer (Merck, pH = 7.0) hergestellt und durch Filtrieren mit Hilfe bakteriendichter Filter (im Fall der Monocarbonsäuren C_6 - C_{11} und Dicarbonsäuren C_4 und C_{10}) oder durch Autoklavieren (bei den Monocarbonsäuren C_{12} - C_{14}) sterilisiert. Dann wurden 0.3 ml davon in den Hauptraum der Reaktionsgefäße gegeben, so daß im Gefäß mit den 3 ml Suspension

eine Endkonzentration von 0.5 bzw. 5.0 Mol erreicht wurde. Die Ergebnisse von einigen Versuchen sind in den Abb. 25 - 33 aufgezeichnet.

Alle angebotenen Säuren wurden oxydiert, wenn auch mit verschiedener Intensität. Die Oxydationskurven zeigen nach 20 - 40 Std. fast alle eine Abkrümmung, deren Ursache bei den bisherigen Experimenten nicht gefunden werden konnte. Doch stets ist der O_2-Verbrauch der Gefäße mit Säurezusatz auch nach langer Versuchsdauer noch größer als bei den Kontrollen, die zur Messung der endogenen Atmung verwandt wurden. Im allgemeinen kann bei den Kurven für die Oxydation der Säuren in den ersten Stunden eine leichte Aufkrümmung festgestellt werden (Abb. 26, 27, 28, 29, 30, 31), sie tritt im Falle der Bernsteinsäure besonders klar hervor (Abb. 32).

Eine Kurve mit sehr starker Aufkrümmung wurde bei 5.0 mMol Caprylsäurezugabe erhalten. Sie wurde als Wachstumskurve aufgefaßt, da in den entsprechenden Gefäßen Häutchen aus neugebildeten Nocardien auftraten.

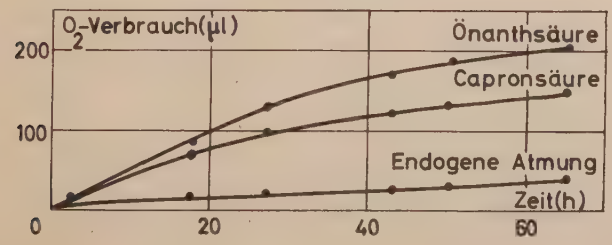

Abb. 25: Oxydation von Capron- und Oenanthsäure durch Noc. hydrocarbon. - Zellmaterial 105 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
- Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salze in 0.3 ml Phosphatpuffer, pH = 7.0, zur Suspension, Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus je 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (end. Atm.)

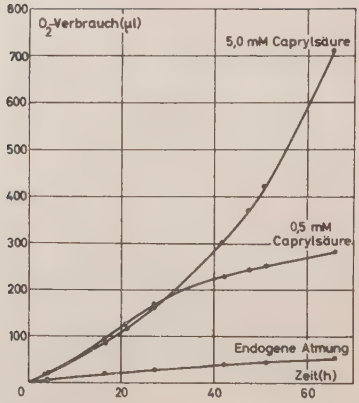

Abb. 26: Oxydation von Caprylsäure durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 56 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatpuffer, pH = 7.0, zur Suspension, Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 bzw. 5.0 mMol, Mittelwerte aus je 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (end. Atm.)

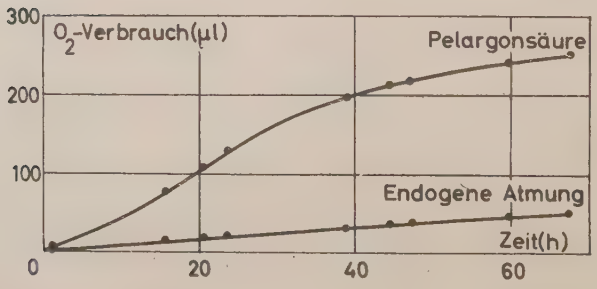

Abb. 27: Oxydation von Pelargonsäure durch Noc. hydrocarb. Zellmaterial 113 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (end. Atm.)

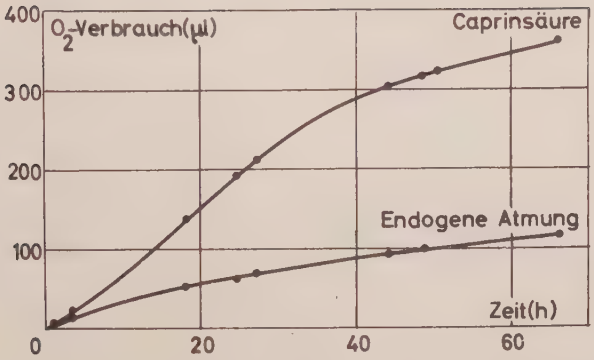

Abb. 28: Oxydation von Caprinsäure durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 42 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus 4 (Substratoxyd.) oder 2 Parallelen (endog. Atm.)

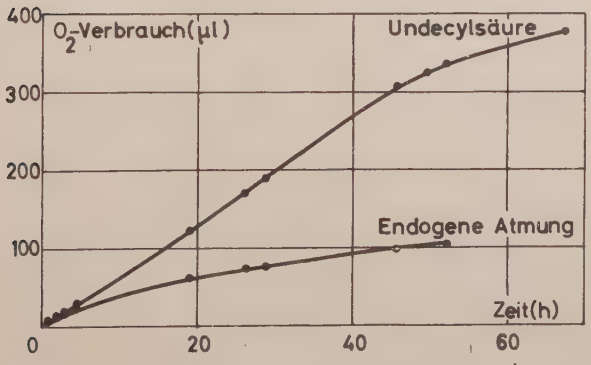

Abb. 29: Oxydation von Undecylsäure durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 42 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Substratoxydation: Mittelwert aus 4 Parallelen.

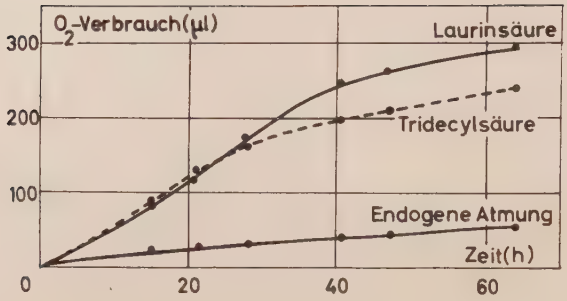

Abb. 30: Oxydation von Laurin- und Tridecylsäure durch Noc. hydrocarbon. - Zellmaterial 62 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert.
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salze in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus je 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (endog. Atm.)

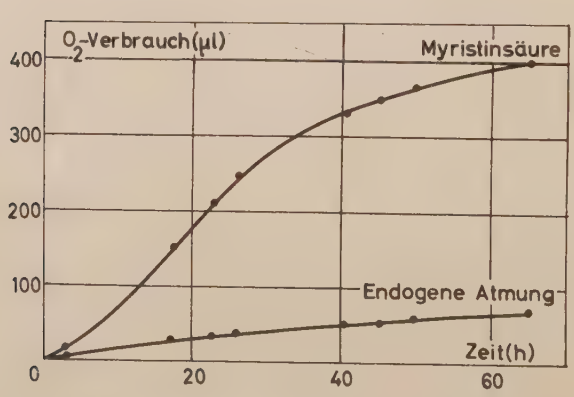

Abb. 31: Oxydation von Myristinsäure durch Noc. hydrocarb. Zellmaterial 44 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (endog. Atm.)

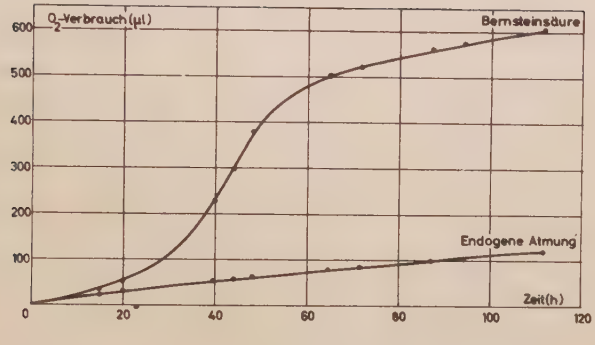

Abb. 32: Oxydation von Bernsteinsäure durch Noc. hydrocarb. Zellmaterial 64 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatp., pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 5.0 mMol, Mittelwerte aus 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (endog. Atm.)

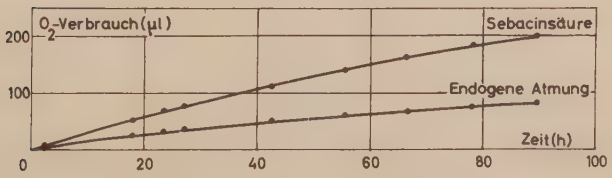

Abb. 33: Oxydation von Sebacinsäure durch Noc. hydrocarbon. Zellmaterial 53 Tage unter Esso-Varsol vorkultiviert
Hauptraum: 3 ml Suspension
Mitteleinsatz: 0.3 ml Karbonatpuffer
Substrat: Na-Salz in 0.3 ml Phosphatpuffer, pH = 7.0, zur Susp., Konzentration im Reaktionsgefäß 0.5 mMol, Mittelwerte aus 4 (Substratoxyd.) oder 3 Parallelen (endog. Atm.)

In der folgenden Tab.10 sind die Q_{O_2}- und Q_T-Werte der Säuren verzeichnet.

Säure	Konzentration (mMol)	Alter des Zellmaterials (d)	Q_{O_2}	Q_{50}
Capron-	0.5	105	3.6	4.4
Önanth-	0.5	105	5.0	6.2
Capryl-	0.5	56	7.4	5.6
Capryl-	5.0	56	18.7	9.1
Pelargon-	0.5	113	4.3	5.5
Caprin-	0.5	42	4.0	3.2
Undecyl-	0.5	42	4.1	3.2
Laurin-	0.5	62	7.0	5.9
Tridecyl-	0.5	62	5.6	4.7
Myristin-	0.5	44	12.4	5.8
Bernstein-	0.5	53	2.7	1.7
Bernstein-	5.0	64	9.2	6.2
Sebacin-	0.5	53	4.3	2.4

Tab.10: Oxydation von Säuren durch Noc. hydrocarbon.
Q_{O_2} = O_2-Verbrauch pro Stunde und mg Bakterientrockensubstanz
Q_{50} = Verhältnis von Substratoxydation zu endogener Atmung 50 Stunden nach Versuchsbeginn.

Die ermittelten Werte schwanken stark und unregelmäßig, so daß sich daraus kein klares Bild über die Stärke der Oxydation in Abhängigkeit von der Kettenlänge gewinnen läßt. Nur soviel kann man sagen, daß eine Steigerung der Substratkonzentration auf das Zehnfache in diesem Bereich eine erhöhte Oxydation zur Folge hat.

Leider mußten die Versuche, den optimalen Konzentrationsbereich der Substrate zu ermitteln, wegen der Schwierigkeiten bei der Darstellung der fettsauren Salze erfolglos abgebrochen werden.

d. CO_2-Bedürfnis

Die bisherigen Untersuchungen hatten gezeigt, daß Noc. hydrocarbon. Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde und Säuren oxydiert. Es war weiter von großem Interesse, festzustellen, ob die Energie der Oxydation von diesem Organismus für eine CO_2-Assimilation benutzt wird. Frühere Versuche in Weckgläsern, bei denen durch Zusatz von H_2SO_4 aus $BaCO_3$ zusätzlich 5 % CO_2 entwickelt wurden, hatten keine fördernde Wirkung ergeben. In einem Fall, wo außerdem Petroleum zugegen war, wurde merkwürdigerweise sogar eine völlige Hemmung des Wachstums beobachtet.

Bei einem weiteren Versuch in Exsikkatoren mit 100-ml-Weithals-Erlenmeyer-Kolben und 40 ml mineralischer Nährlösung wurde die zusätzliche CO_2-Gabe auf 0.5 % gesenkt, doch ein positiver Effekt war auch jetzt nicht festzustellen. In demselben Versuch wurde in einem anderen Exsikkator das CO_2 ganz entzogen. Dazu befanden sich im Unterteil des Exsikkators 500 ml 2-molarer KOH. Die darin enthaltene Luft wurde durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe und Einströmenlassen von frischer Luft CO_2-frei gemacht, die vorher mehrere Waschflaschen mit KOH passiert hatte. Ein weiterer Exsikkator enthielt gewöhnliche Luft und schließlich wurden noch einige Parallel-Kulturen im gleichen dunklen Schrank ohne Exsikkatoren angesetzt. Es bestand nur der Unterschied, daß die Laborluft zu diesen Kulturen freien Zutritt hatte.

Nach 128 Tagen wurde der Versuch beendet. Bei den Kulturen ohne CO_2 (- CO_2) war auf keinem Kolben ein Zuwachs festzustellen. Alle Kolben in den Exsikkatoren mit normalem CO_2-Gehalt (normal) und der zusätzlichen CO_2-Gabe von 0.5 % (+ CO_2) waren mäßig bewachsen. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich die baldige Erschöpfung der Energiequelle wie z.B. des Esso-Varsols und evtl. auch des Sauerstoffs, da

ja mit Schließen der Exsikkator-Deckel ein Nachströmen der verbrauchten Stoffe verhindert wurde.

Dagegen zeigten die freistehenden Kolben (frei) alle einen dichten Bewuchs der Nährlösungsoberfläche mit Nocardien.

In Tab. **11** sind die Werte für den $KMnO_4$-Verbrauch zusammengefaßt.

Verbrauch an n/100 $KMnO_4$ (ml)	Exsikkatoren				Frei	Kontr.
	Normal	$+CO_2$	$-CO_2$	Kontrolle		
	2.77	2.81	2.54	2.69	7.55	3.71

Tab. **11**: Zuwachs von Noc. hydrocarbon. auf mineral. Nährlösung in Exsikkatoren mit verschiedenem CO_2-Gehalt oder freistehend unter Laborluft, gemessen am Permanganat-Verbrauch. Mittelwerte, Zahl der Parallelen 2 - 7

Das äußere Bild wird durch diese Werte nur wenig gestützt, mit Ausnahme der freistehenden Kulturen, bei denen eine merkbare Zunahme zu konstatieren ist. Die Differenz der Werte zwischen "normal" und "+ CO_2" einerseits und "- CO_2" andererseits gibt somit den wahren Unterschied zwischen mäßigen und keinem Wachstum nur ungenügend wieder.

Nach diesem Befund war es immerhin noch denkbar, daß bei Gegenwart eines Kohlenwasserstoffs trotz Fehlen von äußerem CO_2 Wachstum von Noc. hydrocarbon. auftrat. Es konnte ja beim Abbau des Kohlenwasserstoffs Kohlendioxyd oder ein sonstiger C-Körper entstehen, die dann zum Aufbau neuer Zellsubstanz verwendet werden. Aber ein entsprechend durchgeführter Exsikkatorversuch mit Decan verlief negativ.

Zusammenfassend läßt sich demnach sagen: Kohlendioxyd ist zum Wachstum von Noc. hydrocarbon. unbedingt erforderlich, auch wenn ein Kohlenwasserstoff zugegen ist.

e. Kohlenstoffeinbau in die Aminosäuren des Zellmaterials

Durch diesen letzten Versuch sollte ermittelt werden, ob das für das Wachstum von Noc. hydrocarbon. unbedingt nötige CO_2 wirklich assimiliert wird. Weiterhin sollte geklärt werden, ob ein zugegebener Kohlenwasserstoff nicht nur als Energiequelle, sondern auch als C-Quelle für Noc. hydrocarbon. dient. Es wurden 100-ml-Enghals-Erlenmeyer-Kolben mit 30 ml Standardnährlösung (ST) und Wattestopfen-Verschluß benutzt. Die Beimpfung erfolgte mit je einer Platin-Öse Zellmaterial. Dann wurden die Kulturkolben in Exsikkatoren oder Glaszylinder mit Schliffdeckel gestellt. Im ersten Fall wurden zusätzlich 0.05 % $C^{14}O_2$ aus $BaC^{14}O_3$ mit $HClO_4$ entwickelt, und außerdem erhielten die Exsikkatoren je ein Gefäß mit Decan zum besseren Wachstum. Im zweiten Fall wurde auf eine zusätzliche CO_2-Gabe verzichtet, in die Glaszylinder wurden aber Fläschchen mit markiertem C^{14}_1-Undecan hineingestellt, das mit unmarkiertem Undecan verdünnt wurde. Alle Anzuchtgefäße wurden im Brutschrank bei 30 °C bebrütet.

Nach 30 Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Alle Kulturkolben waren gut bewachsen. Mit Hefewasser-Bouillon wurde auf Reinheit geprüft. Nach einigen Tagen wurden die Nocardienzellen auf Membranfiltern gesammelt, getrocknet und hydrolysiert. Das Zellhydrolysat wurde auf Aminosäuren chromatographiert, deren Radioaktivität dann gemessen wurde. Es sei noch betont, daß die Aminosäuren hierbei nur als ein besonders gutes Beispiel zum Beweis des Einbaus des markierten Kohlenstoffs in das Zellmaterial herausgegriffen wurden. Fernerhin sollte keine quantitative Aussage im Hinblick auf die markierten Ausgangssubstanzen gemacht werden. Es kam lediglich darauf an, den C^{14}-Einbau in die Aminosäuren überhaupt nachzuweisen und die relative Mar-

kierung der einzelnen Aminosäuren untereinander (Verteilungsmuster) bei $C^{14}O_2$ einerseits und C^{14}_1-Undecan andererseits zu vergleichen. Die folgende Tab. 12 gibt Auskunft darüber.

Aminosäure	$C^{14}O_2$		C^{14}_1-Undecan	
	Aktivität Imp/Min	Platzziffer (Stärke der Markierung)	Aktivität Imp/Min	Platzziffer (Stärke der Markierung)
Leucin	27	13	72	12
Isoleucin	30	12	43	13
Valin	47	8	133	8
Prolin	32	11	130	9
Alanin	57	5	265	3
Threonin	53	7	125	10
Glycin/Serin	85	2	224	5
Arginin	122	1	243	4
Lysin	62	4	211	7
Cystin	56	6	212	6
Glutaminsäure	46	9	446	1
Asparaginsäure	80	3	290	2
Start	42	10	90	11
Blindwert (Papier)	22	14	23	14

Tab. 12: Aktivitäten der Aminosäureflecken zweier Chromatogramme von Noc. hydrocarbon. bei Anzucht mit $C^{14}O_2$ oder C^{14}_1-Undecan.

In beiden Fällen konnte der markierte Kohlenstoff in 13 der häufigsten Aminosäuren wiedergefunden werden. Doch ergibt sich ein besonders ins Auge fallender Unterschied. Bei Anzucht mit $C^{14}O_2$ ist das Arginin wesentlich stärker als alle übrigen markiert. Diese Schlüsselposition nimmt bei Kultur unter C^{14}_1-Undecan-Atmosphäre dagegen die Glutaminsäure ein.

Abgesehen davon ist bei den beiden unterschiedlichen Bedingungen keine große Verschiedenheit in der Reihenfolge der Aminosäuren festzustellen, wenn man sie nach der Stärke der Markierung ordnet.

f. Schlußbetrachtungen

1) Diskussion der Literatur

Es gibt eine große Anzahl von Mikroorganismen, die Kohlenwasserstoffe oxydieren. Eine gute Zusammenstellung findet sich bei Z o b e l l (1950). Allgemein gilt, daß die langkettigen Kohlenwasserstoffe schneller und durch eine größere Anzahl von Mikroorganismen angegriffen werden als diejenigen mit geringerem Molekulargewicht. Die Grenze liegt etwa bei C_{20}, da dann die Löslichkeit in Wasser so gering ist, daß dadurch ein schneller Angriff verhindert wird. Weiterhin hat sich gezeigt, daß Paraffin-Kohlenwasserstoffe besser und schneller, sowie durch mehr Arten von Bakterien verwertet werden als cyclische Kohlenwasserstoffe. Obligate Kohlenwasserstoff-Bakterien scheint es, wie S c h l e g e l (1960) hervorhebt, nicht zu geben. Bakterien, die aromatische Kohlenwasserstoffe angreifen, nutzen im allgemeinen auch aliphatische Kohlenwasserstoffe aus. Jedoch schließt die Verwendung von paraffinischen Kohlenwasserstoffen bei den meisten Arten nicht notwendig eine Nutzung von aromatischen Kohlenwasserstoffen ein. Meistens ist die Oxydation vollständig und führt nur zu CO_2 und H_2O. Über den Verlauf des Abbaus der aliphatischen Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen liegen nur wenige Untersuchungen vor, und genaue Ergebnisse konnten bisher nicht erhalten werden. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der erste Oxydationsschritt. Die meisten Untersucher bedienten sich einer indirekten Methode, indem die mutmaßlichen Zwischenprodukte der Oxydation

den Bakterien angeboten und ihre Verwertung als Beweis ihres intermediären Charakters beim Abbau angesehen wurden. Es sei noch einmal betont, daß auf diese Weise kein schlüssiger Beweis, sondern nur ein Indiz dafür geliefert wird. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß ein von den Bakterien enzymatisch gebildetes Zwischenprodukt häufig in einer aktivierten Form vorliegt. Die Unfähigkeit, ein vermutetes Zwischenprodukt zu oxydieren, ist demnach noch kein Beweis dafür, daß der Abbau nicht doch über dieses verläuft. Vielleicht können die betr. Bakterien nicht die aktivierte Form bilden.

L a d d (1956) fand, daß ein Corynebacterium aliphatische Kohlenwasserstoffe (C_8 - C_{16}) ohne Lag-Phase oxydierte. Die RQ-Werte zeigten die vollständige Oxydation zu CO_2 und H_2O an. Außerdem wurden normale Fettsäuren (C_1 - C_{10}) und normale primäre Alkohole (C_2 - C_{11}) oxydiert. Ein guter O_2-Verbrauch ergab sich mit Methyl-nonyl-keton, ein schlechter dagegen mit Decylaldehyd. Dies kann als Hinweis dafür dienen, daß die Oxydation des Kohlenwasserstoffs vielleicht nicht am terminalen C-Atom ansetzt. Womöglich konnte das Bakterium den Decylaldehyd nicht in die nötige aktivierte Form überführen.

Eine Stütze für die terminale Oxydation der aliphatischen Kohlenwasserstoffe erbrachten die ebenfalls nach der indirekten Methode durchgeführten Untersuchungen von H a r r i s (1957) mit einer Micrococcus-Art. Auch hier war die Oxydation vollständig, wie die RQ-Werte von 0.66 zeigten. Außer den Kohlenwasserstoffen (C_7 - C_{18}) wurden, wenn auch schlechter, die entsprechenden primären Alkohole und wesentlich besser die Salze der Fettsäuren oxydiert.

P o m o r t s e v a (1957) arbeitete mit Pseudomonas pyocyanea. Heptan, Octan und Decan,

nicht aber aromatische Kohlenwasserstoffe, dienten als C- und Energiequelle. Aldehyde und flüchtige Säuren (Ameisen-, Essig- und Propionsäure) konnten als Zwischenprodukte isoliert werden.

Bei einem Pseudomonas-aeruginosa-Stamm konnten durch Senez und Konovaltschikoff-Mazoyer (1956) bei Entwicklung auf mineralischer Nährlösung mit Heptan im Kulturfiltrat Fettsäuren (C_2 - C_7) und Bernsteinsäure chromatographisch nachgewiesen werden. Es wurde daraus geschlossen, daß eine endständige Methylgruppe des Kohlenwasserstoffs zur entsprechenden Fettsäure oxydiert wird. Dekarboxylierung und weitere Oxydation führen zur um ein C-Atom verminderten Fettsäure. Dieser Prozeß kann sich mehrmals wiederholen. Die bekannte ß-Oxydation der Fettsäuren spielt hierbei also keine Rolle, da sowohl Fettsäuren mit gerader als auch ungerader C-Zahl gefunden wurden. Aus dem Auffinden von Bernsteinsäure wurde der Schluß gezogen, daß Heptan oder seine Folgeprodukte gleichzeitig auch am anderen Ende der C-Kette oxydiert werden können. Es findet in diesem Fall also sowohl α- als auch ω-Oxydation beim Abbau des Kohlenwasserstoffs bzw. der Fettsäuren statt.

Treccani und Canonica (1953) konnten bei einem Corynebacterium, das mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen als einziger C-Quelle wuchs, ebenfalls papierchromatographisch Essig-, Propionsäure und Mischungen höherer Fettsäuren mit mehr als 8 C-Atomen im Kulturfiltrat nachweisen. Auf Grund späterer Warburg-Versuche unter Hinzuziehen weiterer Bakterien, die alle aliphatische Kohlenwasserstoffe als einzige C-Quelle benutzten, wurde eine terminale Oxydation bis zur Fettsäure und anschließender Verlust nur eines C-Atoms (De-

karboxylierung) angenommen. Es konnten jedoch keine Anzeichen für eine ω-Oxydation der Fettsäuren gefunden werden (T r e c c a n i et al. 1955).

T h i j s s e und v a n d e r L i n d e n (1958) , die mit einem Pseudomonas-Stamm experimentierten, glauben klar gezeigt zu haben, daß der Abbau des Kohlenwasserstoffe durch Oxydation einer endständigen Methylgruppe vor sich geht, was über Alkohole und Aldehyde zur Fettsäure führt. Die als Beweis angeführte Oxydation dieser Verbindungen durch auf Kohlenwasserstoff-Medien herangewachsene Zellen kann aber, wie schon erwähnt wurde, nur als ein Hinweis gewertet werden. Auch läßt sich wohl nicht - wie es durch die Verfasser geschieht - aus der höheren Oxydationsrate der Alkohole, Aldehyde und Fettsäuren mit gerader C-Zahl gegenüber denen mit ungerader C-Zahl bei Versuchen mit hexanadaptierten Zellen mit Sicherheit ein ß-Oxydationsmechanismus ableiten.

Nach den Ergebnissen von S i l l i k e r und R i t t e n b e r g (1952) ist die ß-Oxydation von Fettsäuren bei Serratia marescens nicht der benutzte Abbauweg.

J o h n s o n (1958) fand bei Warburg-Versuchen mit Spicaria violacea, daß Fettsäuren von C_2 - C_7 und C_{16} - C_{18} die Sauerstoff-Aufnahme stimulierten. Dagegen ermittelte er merkwürdigerweise keine Förderung, z.T. sogar eine Hemmung des O_2-Aufnahme bei C_8 - C_{14}-Fettsäuren. Im allgemeinen und auch bei Noc. hydrocarbon. werden diese Fettsäuren gut oxydiert (C a l l e l y et al., 1958; S i l l i k e r und R i t t e n b e r g , 1951).

Einen α-Oxydationsweg bei Fettsäuren konnten M a r t i n und S t u m p f (1959) bei Extrakten aus Kotyledonen von keimenden Erdnüssen wahrscheinlich machen. Durch peroxydative Dekarboxylierung der Fettsäure wird der Aldehyd mit einem C-

Atom weniger gebildet, der mit Hilfe von DPN zur Säure oxydiert wird.

Von Kester und Foster (1960) konnten schließlich aus Wachstumskulturen eines unidentifizierten, stäbchenförmigen Bakteriums mit flüssigen Kohlenwasserstoffen die homologen Dicarbonsäuren isoliert werden, was für eine ω-Oxydation spricht. Bei ihren Untersuchungen mit dem denitrifizierenden Pseudomonas stutzeri stellten Hansen und Kallio (1957) fest, daß Nitrat nicht als Oxidant für Dodecan dienen konnte, das aber sofort bei Sauerstoff-Zugabe oxydiert wurde. Es wird deshalb vermutet, daß eine Peroxydation oder ein anderer sauerstoffbenötigender Prozeß der erste Schritt der biologischen Oxydation von Kohlenwasserstoffen ist.

Leadbetter und Foster (1959 a) folgerten aus ihren Untersuchungen mit O^{18} bei methan-, äthan- und propanoxydierenden Bakterien, daß die Kohlenwasserstoff-Nutzung mit einem verstärkten Einbau molekularen Sauerstoffs in die Bakteriensubstanz einhergeht.

Bei weiteren Experimenten mit Pseudomonas methanica auf Mineralsalzlösung unter Kohlenwasserstoff-Atmosphäre konnten diese Autoren aus dem Kulturfiltrat nur Oxydationsprodukte mit der gleichen C-Zahl isolieren. Sie fanden unter Äthan-Atmosphäre Äthanol, Acetaldehyd und Essigsäure, unter Propan-Atmosphäre Propanol, Aceton und Propionsäure, unter n-Butan-Atmosphäre n-Butanol, 2-Butanon und n-Buttersäure. Äthylen ist kein Zwischenprodukt des Äthanabbaus (Leadbetter und Foster 1959 b, 1959 c und 1960). Es war das erste Mal, daß Methylketone bei der mikrobiellen Kohlenwasserstoff-Oxydation gefunden wurden. Die Isolierung von 2-Hexadecanon aus dem Kulturfiltrat einer gemischten Population von Bakterien, die auf Mineralnährlösung

mit Hexadecan gewachsen waren, durch S t e w a r t und K a l l i o (1957) hatte sich als Irrtum erwiesen. Von L e a d b e t t e r und F o s t e r wird noch darauf hingewiesen, daß das gleichzeitige Auftreten von homologen terminalen und α-Oxydationsprodukten in den Kulturfiltraten nicht notwendigerweise den simultanen Ablauf auf zwei unabhängigen Kohlenwasserstoff-Oxydationswegen bei Pseudomonas methanica einschließt. Als mögliche, vorerst noch hypothetische Erklärung für das gleichzeitige Auftreten von 1- und 2-Oxydationsprodukten wird die Bildung von freien Radikalen in 1- und 2-Stellung aus dem Kohlenwasserstoff herangezogen, die miteinander im Gleichgewicht stehen und über Hydroperoxyde zu Fettsäure bzw. Methylketon oxydiert werden.

S t e w a r t et al. (1959) gelang es bei einem gramnegativen Coccus, der auf einem Hexadecanmedium wuchs, die Anhäufung von Cetylpalmitat nachzuweisen. Dieses Wachs förderte das Wachstum des Testorganismus und wurde auch durch ihn oxydiert, allerdings nur sehr langsam, was wahrscheinlich auf die Unlöslichkeit des Wachses zurückgeführt werden muß.

Auch bei einer Boden-Nocardia fanden sich bei Wachstum auf Hexadecan- oder Octadecan-Medium die entsprechenden Wachse Cetylpalmitat und Octadecylstearat. Sie stellen aber wahrscheinlich nicht die gewöhnlichen Zwischenprodukte der n-Alkanoxydation dar (R a y m o n d und D a v i s 1960).

2) Diskussion der eigenen Versuche

Die Ergebnisse der Warburg-Versuche mit Noc. hydrocarbon. zeigen an, daß hier der Abbau der Kohlenwasserstoffe durch Oxydation einer endständigen Methylgruppe über Alkohol und Aldehyd bis zur Säure erfolgen kann. Die negativen Resultate mit den niederen (C_6 und C_7) Alkoholen und Aldehyden stellen

nicht unbedingt einen Widerspruch dazu dar. Es ist ja möglich, daß diese Stoffe bei der enzymatischen Produktion durch die Bakterien in einer nicht schädigenden, aktivierten Form vorliegen oder aber durch schnelle Weiterverarbeitung eine toxische Konzentration überhaupt nicht erreicht wird, daß also in den eben erwähnten Versuchen diese Konzentration überschritten war.

Der weitere Abbau der Säuren durch Noc. hydrocarbon. geschieht gewiß nicht durch Dekarboxylierung; denn dann müßte der C^{14}-Einbau in die Aminosäuren der Zellsubstanz bei Anzucht mit $C^{14}O_2$ und C^{14}_1-Undecan völlig gleich verlaufen. Das ist aber, wie gezeigt wurde, nicht der Fall. Die Verwertung von Bernstein- und Sebacinsäure liefert einen Hinweis dafür, daß der Kohlenwasserstoff- bzw. Fettsäureabbau vielleicht über eine Dicarbonsäurestufe vor sich geht. Die vorliegenden Befunde sprechen weder für noch gegen die Beteiligung einer ß-Oxydation bei Noc. hydrocarbon. Um hier eine Entscheidung treffen zu können, wären weitere Untersuchungen nötig.

Das auf Grund der niedrigen RQ-Werte zu vermutende, sauerstoffreiche, sich anhäufende Zwischenprodukt, kann durchaus eine niedere Fettsäure sein. Selbst wenn sie durch Noc. hydrocarbon. oxydiert werden kann, ist eine Anhäufung möglich. Dazu ist es nur erforderlich, daß die oxydative Verarbeitung langsamer abläuft als die Bildung der fraglichen Substanz. Allerdings trat selbst bei langdauernder Kultur keine Versäuerung der Nährlösung auf, was die Bildung einer Säure gestützt hätte. Der pH-Wert blieb unverändert oder es war im Gegenteil sogar bei Einstellung der Nährlösung auf pH-Werte unter 7.0 ein Ausweichen zum Alkalischen zu bemerken. Vielleicht wird aber auch ein Ester durch Reaktion des entstandenen Alkohols mit der ebenfalls produzierten homologen Säure gebildet. Eine Klärung dieser Frage

können selbstverständlich nur fortführende Versuche bringen.

K u z n e t s o v und T e l e g i n a (1957) konnten bei propanoxydierenden Bakterien eine Chemosynthese nachweisen. Die Propanoxydation diente dabei als Energiequelle für die CO_2-Assimilation. Auch für Noc. hydrocarbon. konnte zumindestens sehr wahrscheinlich gemacht werden, daß die Kohlenwasserstoff-Oxydation die Energiequelle für den Kohlenstoffeinbau aus CO_2 in die Zellsubstanz ist. Jedoch sind die Kohlenwasserstoffe nicht nur Energie- sondern auch Kohlenstoffquelle. Eine Aussage über die Art des assimilierten Produktes kann bis jetzt nicht gemacht werden.

Es ist wahrscheinlich, daß durch Untersuchungen an Noc. hydrocarbon. mit zellfreien Extrakten und den beteiligten Enzymsystemen genauere Ergebnisse über den Abbauweg der Kohlenwasserstoffe und daran anknüpfend auch über das Assimilationsprodukt gewonnen werden können und dadurch mehr Licht in das noch herrschende Dunkel bei diesem stoffwechselphysiologisch interessanten Bakterium gebracht wird.

D. Zusammenfassung

1) Ein neu isolierter Actinomycet, N o c a r d i a h y d r o c a r b o n o x i d a n s n. spec., wird beschrieben. Er wächst gut und reichlich, aber langsam auf rein mineralischen Nährmedien bei Zutritt von Laborluft. Auch auf einigen organischen Nährböden tritt Wachstum auf.

2) Petroleum und flüssige, aliphatische Kohlenwasserstoffe in Dampfform fördern das Wachstum erheblich.

3) Leuchtgas und Wasserstoff haben dagegen keine begünstigende Wirkung. Benzol, Toluol, Xylol, Aceton, Pyridin und die niederen Alkohole n-Butanol, Hexyl- und Heptylalkohol, sowie Capron- und Önanthaldehyd zeigen einen Hemmeffekt und verhindern das Wachstum.

4) Aliphatische Kohlenwasserstoffe vom Octan bis zum Hexadecan werden in Dampfform durch Noc. hydrocarbon. oxydativ verwertet. Die Oxydation ist unvollständig, wie der niedrige RQ-Wert um 0.20 zeigt.

5) Primäre Alkohole der Kettenlänge C_6 - C_{12} und Aldehyde (C_{10} - C_{12}) werden ebenfalls durch Noc. hydrocarbon. oxydativ angegriffen.

6) Der relativ niedrige RQ-Wert von 0.46 unter Dekanol-Atmosphäre läßt auch hierbei auf einen unvollständigen Abbau schließen.

7) Auch die Monocarbonsäuren von der Capron- bis zur Myristinsäure sowie die Dicarbonsäuren Bernstein- und Sebacinsäure werden durch Noc. hydrocarbon. oxydiert.

8) CO_2 ist - auch in Gegenwart eines Kohlenwasserstoffs - unbedingt zum Wachstum nötig. Das Kohlendioxyd wird in die Aminosäuren der Zellsubstanz eingebaut.

9) Die oxydablen Kohlenwasserstoffe dienen nicht nur als Energie- sondern auch als Kohlenstoffquellen. Der C-Einbau erfolgt auf einem von der CO_2-Assimilation verschiedenen Wege.

E. Literatur

BARDI, V.:und G. BORETTI: Osservasioni sul metabolismo endogeno di un proactinomyces: Nocardia rugosa. G. Microbiol. 6, 91-102 (1958)

BERGEY's Manual of determinative bacteriology, 7th ed., Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1957

CALLELY, A.G., S. DAGLEY und B. HODGSON: Oxidation of fatty acids by cellfree extracts of a vibrio. Biochem. J. 69, 173-181 (1958)

DREWS, G.: Zum Problem der granulären Einschlüsse bei Bakterien. Ber. dtsch. bot. Ges. 70,(23) (1958)

ETTLINGER, L., R. CORBAZ und R. HÜTTER: Zur Systematik der Actinomyceten IV. Eine Arteinteilung der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici. Arch. Mikrobiol. 31, 326-358 (1958)

GAUSE, G.F., T.P. PREOBRASHENSKAJA, E.S. KUDRINA, N.O. BLINOW, I.D. RJABOWA, M.A. SWESCHNIKOWA: Zur Klassifizierung der Actinomyceten. VEB G. FischerVerlag Jena 1958

HANSEN, R.W. und R.E. KALLIO: Inability of nitrate to serve as a terminal oxidant for hydrocarbons. Science 125, 1198 (1957)

HARRIS, J.O.: Respiration studies of a Micrococcus capable of oxidizing hydrocarbons. Arch. Biochem. 70, 457-463 (1957)

HENSEN, A.: Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. Arch. Mikrobiol. 26, 373-414 (1957)

HIRSCH, P : Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Nocardia petroleophila n. sp.. Arch. Mikrobiol. 29, 368-393 (1958)

HIRSCH, P.: Einige weitere, von Luftverunreinigungen lebende Actinomyceten und ihre Klassifizierung. Arch. Mikrobiol. 35, 391-414 (1960)

HIRSCH, P. und H. ENGEL: Über oligocarbophile Actinomyceten. Ber. dtsch. bot. Ges. 69, 441-454 (1956)

JOHNSON, G.T.: Oxidation of fatty acids by cell suspension of Spicaria violacea. Mycologia (N.Y.) 50, 677-680 (1958)

KESTER, A.S. und J.W. FOSTER: Diterminal oxidation of long chain alkanes by a bacterium. Bact. Proc. 1960, 168

KRASSILNIKOV, N.A.: La classification des Actinomycètes par la méthode de la variation expérimentale. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 96, 434-447 (1959 a)

KRASSILNIKOV, N.A.: Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1959 b

KUBEL, in TIEMANN-GÄRTNER: Die chemische und mikroskopisch-bakteriologische Untersuchung des Wassers, 3. Aufl., Fr. Vieweg Verlag Braunschweig 1889

KUZNETSOV, S.J. und S.P. TELEGINA: Some data on the physiology of propane oxidizing bacteria. Mikrobiologija 26, 513-518 (1957)

LADD, J.N.: The oxidation of hydrocarbons by soil bacteria. Aust. J. biol. Sci. 9, 92-104 (1956)

LEADBETTER, E.R. und J.W. FOSTER: Incorporation of molecular oxygen in bacterial cells utilizing hydrocarbons for growth. Nature (Lond.) 184, 1428-1429 (1959 a)

LEADBETTER, E.R. und J.W. FOSTER: Terminal oxidation of gaseous hydrocarbons by Pseudomonas methanica (Söhngen). Bact. Proc. 1959 b, 118-119

LEADBETTER, E.R. und J.W. FOSTER: Oxidation products formed by the bacterium Pseudomonas methanica. Arch. Biochem. 82, 491-492 (1959 c)

LEADBETTER, E.R. und J.W. FOSTER: Bacterial oxidation of gaseous alkanes. Arch. Mikrobiol. 35, 92-104 (1960)

LINDENBEIN, W.: Über einige chemisch interessante Actinomyceten-Stämme und ihre Klassifizierung. Arch. Mikrobiol. 17, 361-383 (1952)

MARTIN, R.O. und P.K. STUMPF: Fat metabolism in higher plants XII. α-oxidation of long chain fatty acids. J. biol. Chem. 234, 2548-2554 (1959)

NÄVEKE, R.: Formiatoxydation und Kohlenstoff-Assimilation bei Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 27, 375-399 (1957)

POMORTSEVA, N.V.: Die Bildung von organischen Säuren und Aldehyden in den Kulturen des Pseudomonas pyocyanea bei der Oxydation von Kohlenwasserstoffen. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 117, 896-899 (1957) cit. nach Ber. wiss. Biol. 126, 190 (1958)

RAYMOND, R.L. und J.B. DAVIS: N-alkane utilization and lipid formation by a Nocardia. Bact. Proc. 1960, 158

SCHLEGEL, H.G.: Kohlenwasserstoffe verwertende Mikroorganismen. Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. V, Teil 2, 715-734. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960.

SENEZ, J.C. und M. KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER: Formation d'acides gras dans les cultures de Pseudomonas aeruginosa sur n-heptane. C. r. Acad. Sci. (Paris) 242, 2873-2875 (1956)

SILLIKER, J.H. und S.C. RITTENBERG: Studies on the aerobic oxidation of fatty acids by bacteria II. J. Bact. 61, 661-673 (1951). III. J. Bact. 64, 197-205 (1952)

STEWART, J.E. und R.E. KALLIO: An intermediate in the bacterial oxidation of n-hexadecane. Bact. Proc. 1957, 134

STEWART, J.E., R.E. KALLIO, D.P. STEVENSON, A.C. JONES und D.O. SCHISSLER: Bacterial hydrocarbon oxidation I. Oxidation of n-hexadecane by a gramnegative coccus. J. Bact. 78, 441-448 (1959)

SZABÓ, I., M. MARTON und I. SZABOLCS: Studies on the ecology of Streptomyces griseus Waksman et al. Agrokém. és Talajtan 7, 163-176 (1958) cit. nach Ber. wiss. Biol. 135 53 (1959)

TAYLOR, C.B.: An improved method for the preparation of silica gel media for microbiological purposes. J. gen. Microbiol. 4, 235-237 (1950)

THIJSSE, G.J.E. und A.C. VAN DER LINDEN: N-alkane oxidation by a Pseudomonas. Studies on the intermediate metabolism. Antonie v. Leeuwenhoek 24, 298-308 (1958)

TRECCANI, V. und L. CANONICA: Ossidazione microbica degli idrocarburi alifatici, nota I. Ann. Microbiol. (Milano) 5, 162-172 (1953)

TRECCANI, V., L. CANONICA und M.G. DE GIROLAMO: Ossidazione microbica degli idrocarburi alifatici, nota II. Ann. Microbiol. (Milano) 6, 183-199 (1955)

WAKSMAN, S.A.: Species concept among the Actinomycetes with special reference to the genus Streptomyces. Bact. Reviews 21, 1-29 (1957)

WALLHÄUSSER, K.H.: Die Lochkartei als Hilfsmittel bei der Klassifizierung von Streptomyceten. Arch. Mikrobiol. 33, 170-181 (1959)

ZOBELL, C.E.: Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. Advances Enzymol. 10, 443-486 (1950)

Lebenslauf

Am 19.12.1930 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Hans Nolof und seiner Ehefrau Leonie Nolof geb. Herm in Hamburg geboren. Von 1937 bis 1943 besuchte ich Grundschulen in Hamburg, Karlshafen/Weser und Neufahrn (Niederbayern), danach Mittel- und Oberschulen in Bromberg, Kubitzen (Böhmerwald) und Hamburg. Im Januar 1951 bestand ich die Reifeprüfung an der Klosterschule in Hamburg und studierte anschließend an den Universitäten Hamburg und Tübingen Biologie, Chemie, Mathematik, Philosophie und Pädagogik. Im Januar 1958 legte ich die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Höheren Schulen (Staatsexamen) ab.